

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑪ **DE 39 13 101 A1**

⑤ Int. Cl. 5:
C 12 N 15/00

⑳ Aktenzeichen: P 39 13 101.7
㉑ Anmeldetag: 21. 4. 89
㉒ Offenlegungstag: 31. 10. 90

DE 39 13 101 A1

㉑ **Anmelder:**

Boehringer Ingelheim International GmbH, 6507
Ingelheim, DE

㉒ **Erfinder:**

Maurer-Fogy, Ingrid, Dr.; Himmler, Adolf, Dipl.-Ing.
Dr., Wien, AT; Hauptmann, Rudolf, Dr.,
Ebreichsdorf, AT; Stratowa, Christian, Dr., Wien, AT

⑤A **TNF- α bindende Proteine und dafür kodierende DNAs**

Gegenstand der Erfindung sind DNAs, die mit DNAs, kodierend für TNF- α bindendes Protein oder für verwandte Proteine mit der Fähigkeit, TNF- α zu binden, hybridisieren, diese DNAs selbst und Polypeptide, die von diesen DNAs kodiert werden, sowie ein Verfahren zu deren Herstellung.

Die Erfindung betrifft auch rekombinante DNA-Moleküle zur Klonierung und Expression dieser DNAs und Wirtsorganismen, transformiert mit solchen rekombinanten DNAs. Gegenstand der Erfindung sind weiters die Verwendung der TNF- α bindenden Polypeptide bei Indikationen, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF im Organismus auftritt sowie pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend solche Polypeptide.

DE 39 13 101 A1

Beschreibung

Die Erfindung bezieht sich auf DNA, insbesondere auf rekombinante DNA zur Herstellung von Proteinen mit der Fähigkeit, TNF- α zu binden.

5 Tumornekrosefaktor (TNF- α) wurde erstmals im Serum von Mäusen und Kaninchen gefunden, die mit *Bacillus Calmette-Guerin* infiziert und denen Endotoxin injiziert worden war, und auf Grund seiner cytotoxischen und Antitumoreigenschaften erkannt (1). Er wird vor allem von aktivierten Makrophagen und Monozyten produziert. Zahlreiche Zelltypen, die Ziele für TNF sind, weisen Oberflächenrezeptoren mit hoher Affinität für dieses Polypeptid auf (2); Lymphotoxin (TNF- β) bindet an denselben Rezeptor (3, 4). TNF- α ist identisch mit
10 einem als Cachectin bezeichneten Faktor (5), der die Lipoproteinlipase unterdrückt und bei chronisch-entzündlichen und malignen Erkrankungen zur Hypertriglyceridämie führt (6, 7). TNF- α dürfte an der Regulation des Wachstums sowie an der Differenzierung und Funktion von Zellen, die bei Entzündungen, Immunvorgängen und Hämatopoese eine Rolle spielen, beteiligt sein.

TNF kann auf den Wirtsorganismus durch Stimulation von Neutrophilen (8, 9) und Monocyten sowie durch
15 Hemmung der Replikation von Viren (10, 11) eine positive Wirkung ausüben. Darüber hinaus aktiviert TNF- α die Immunabwehr gegen Parasiten und wirkt direkt und/oder indirekt als Mediator bei Immunreaktionen, entzündlichen Prozessen und anderen Vorgängen im Organismus, wobei die Wirkmechanismen in vielen Fällen noch ungeklärt sind.

Die Verabreichung von TNF- α (12) kann jedoch auch von schädlichen Erscheinungen (13) wie Schock und Gewebeschädigungen begleitet sein, die durch Antikörper gegen TNF- α aufgehoben werden können (14). Eine
20 Reihe von Beobachtungen läßt auf eine Rolle von endogen freigesetztem TNF- α bei verschiedenen pathologischen Zuständen schließen. So scheint TNF- α ein Mediator der Kachexie zu sein, die bei chronisch-invasiven, z. B. parasitären Erkrankungen auftreten kann. TNF- α scheint auch eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese des durch gram-negative Bakterien verursachten Schocks (Endotoxin-Schock) zu spielen; er dürfte an einigen,
25 wenn nicht allen Wirkungen von Lipopolysacchariden beteiligt sein (22). Ebenso wurde eine Funktion von TNF bei den im Rahmen von entzündlichen Prozessen in Gelenken und anderen Geweben auftretenden Gewebeschädigungen sowie bei der Letalität und Morbidität der Graft-versus-host reaction (GVHR) (15) postuliert. Auch wurde ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von TNF im Serum und dem tödlichen Ausgang von Meningokokkenkrankungen berichtet (16).

Weiters wurde beobachtet, daß die Verabreichung von TNF- α über einen längeren Zeitraum einen Zustand
30 von Anorexie und Auszehrung verursacht, die eine ähnliche Symptomatik aufweist wie die Kachexie, die mit neoplastischen und chronischen infektiösen Erkrankungen einhergeht (23).

Es wurde über eine TNF inhibierende Aktivität eines Proteins aus dem Harn von Fieberpatienten berichtet, von dessen Wirkung vermutet wird, daß sie auf einen kompetitiven Mechanismus auf Rezeptorebene selbst
35 (ähnlich der Wirkung des Interleukin-1 Inhibitors (17)) zurückzuführen ist (24).

In Vorversuchen zur vorliegenden Erfindung konnte aus Dialyseharn von Urämiepatienten eine Protein identifiziert werden, das die biologischen Wirkungen von TNF- α hemmt, indem es durch Wechselwirkung mit TNF- α dessen Bindung an seinen Zelloberflächenrezeptor verhindert.

Es wurde festgestellt, daß das TNF- α bindende Protein auch Affinität zu TNF- β aufweist, diese Affinität wurde
40 mit etwa 1/50 der Affinität zu TNF- α bestimmt.

Dieses Protein, im folgenden TNF- α bindendes Protein bzw. TNF-BP genannt, wurde weiters bis zur Homogenität gereinigt. Es weist ein Molekulargewicht von ca. 30 000, bestimmt mittels SDS-PAGE auf, die N-terminale Aminosäuresequenz wurde mit Asp-Ser-Vol-X-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-
45 (Val)-(Pro)-(His)-Leu-Gly-X-Arg-Glu-) bestimmt. (Daneben wurde in Spuren die folgende N-terminale Sequenz nachgewiesen: Leu-(Val)-(Pro)-(His)-Leu-Gly-X-Arg-Glu-.)

Das native TNF-BP wurde als Glycoprotein nachgewiesen.

Es wurde folgende Aminosäurezusammensetzung, angegeben in Aminosäureresten pro Molekül und bestimmt als Mittelwert einer 24- und 48stündigen Hydrolyse, ermittelt:

	Mol Aminosäure/ Mol Protein	Mol-% Aminosäure	
Asp + Asn	27,5	10,9	5
Thr	15,8	6,3	
Ser	20,7	8,2	
Glu + Gln	35,0	13,8	
Pro	9,5	3,8	
Gly	16,0	6,3	10
Ala	4,2	1,7	
Cys	32,3	12,8	
Val	10,8	4,3	
Met	1,1	0,4	
Ile	7,0	2,8	15
Leu	20,2	8,0	
Tyr	6,1	2,4	
Phe	8,1	3,2	
His	11,1	4,4	
Lys	15,7	6,2	20
Arg	11,8	4,7	
Total	252,9	100	

Ein Gehalt an Glukosamin wurde mittels Aminosäureanalyse nachgewiesen.

TNF-BP bildet mit TNF- α einen Komplex; das molare Verhältnis von TNF- α zu TNF-BP wurde mit 1 : 1 bestimmt. TNF-BP konnte im Serum, nicht jedoch im Harn gesunder Personen nachgewiesen werden. Ein erhöhter Titer wurde im Serum und im Harn von Dialysepatienten mit Urämie bestimmt. Als Ausgangsmaterial für die Reinigung von TNF- α bindendem Protein ist somit der Harn von Urämie-Patienten unter laufender Dialysebehandlung (im folgenden als Dialyseharn oder Harn von Dialysepatienten bezeichnet) besonders geeignet.

Die durchgeführten Bindungsversuche zeigten eine dosisabhängige Hemmung der TNF-Bindung an die Zelle durch konzentrierten Dialyseharn. Die Möglichkeit der Interpretation, daß die beobachtete Verringerung der Bindung durch gegebenenfalls im Harn vorhandenen TNF- α selbst oder TNF- β , der um die Bindung konkurriert, verursacht werden könnte, wurden durch den Befund, daß die Verringerung der Bindung durch Anwendung von TNF- α - und TNF- β -Antikörpern nicht aufgehoben werden konnte, ausgeschlossen. Es wurde auch gezeigt, daß die Wirkung des Inhibitors nicht auf seiner Bindung an die Zelle beruht; es konnte vielmehr die Bildung eines Komplexes zwischen TNF- α und TNF-BP direkt nachgewiesen werden. TNF-BP unterscheidet sich somit in seiner Wirkungsweise vom Interleukin-1-Inhibitor, der mit Interleukin-1 um die Bindung an den Zelloberflächenrezeptor konkurriert (17). Der Interleukin-1-Inhibitor beeinträchtigt die Wirkung von TNF- α nicht. Es wurde auch nachgewiesen, daß das TNF- α bindende Protein Affinität zu TNF- β aufweist.

Die Reinigung des TNF bindenden Proteins kann — gegebenenfalls nach Konzentration des Dialyseharns — in mehreren Schritten nach üblichen Methoden der Proteinchemie durchgeführt werden, z. B. mittels fraktionierter Ammoniumsulfatfällung, Ionenaustausch- und Gelpermeationschromatographie, Adsorption, z. B. an Hydroxylapatit oder hydrophobe Adsorption, Affinitätschromatographie, Reverse Phase Chromatographie, wobei diese Schritte grundsätzlich in beliebiger Reihenfolge, gegebenenfalls unter dazwischengeschalteter Dialyse oder Gelfiltration, durchgeführt werden können.

Die Vorreinigung in zwei Schritten mittels Ionenaustauschchromatographie über eine DEAE-Säule und anschließende Gelchromatographie (Sephadex G-75) brachte eine 62fache Anreicherung. Die weitere Reinigung erfolgt vorzugsweise mittels Affinitätschromatographie durch an festes Trägermaterial (z. B. Sepharose) gebundenen TNF- α ; abschließend wird, falls erforderlich, durch weitere chromatographische Schritte, wie Reverse Phase Chromatographie, bis zur Homogenität gereinigt.

Das homogene Protein wurde in hochgereinigter Form erhalten, indem Harn von Dialysepatienten durch Ultrafiltration konzentriert, der konzentrierte Harn dialysiert und zunächst in einem ersten Reinigungsschritt mittels DEAE-Sephacel-Chromatographie auf das Vierfache angereichert wurde. Die weitere Anreicherung erfolgte mittels Affinitätschromatographie durch an Sepharose gebundenen TNF- α . Die Endreinigung wurde mittels Reverse Phase Chromatographie (FPLC) durchgeführt.

Vom hochgereinigten Protein wurde die N-terminale Aminosäuresequenz aufgeklärt.

Das Auftreten erhöhter Titer des TNF-bindenden Proteins sowohl im Serum als auch im Harn von Urämie-Patienten läßt sich damit erklären, daß Proteine dieser Größe, die normalerweise der glomerulären Filtration unterworfen und durch Tubulus-Zellen katabolisiert werden, bei Erkrankungen mit Verlust des Nephrons (z. B. Glomerulonephritis) die mit Verminderung von Ausscheidung und endogenem Katabolismus einhergehen, im Blut wie im Harn akkumuliert werden (18).

TNF-BP kommt offensichtlich die Funktion eines Regulators der TNF-Aktivität mit der Fähigkeit zu, die Konzentrationsänderungen von freiem, biologisch aktivem TNF abzuf puffern. TNF-BP dürfte auch die Ausscheidung von TNF durch die Niere beeinflussen, weil der mit TNF gebildete Komplex, der ein Molekulargewicht von ca. 75 000, bestimmt mittels Gelpermeationschromatographie auf Sephadex G 75 aufweist, im Gegensatz zu TNF nicht durch den Glomerulus zurückgehalten wird.

Das TNF-BP stellt eine von drei Hauptproteinkomponenten aus dem Harn von Dialysepatienten dar, die Affinität zu TNF aufweisen und die gemeinsam mit TNF-BP von der Affinitätschromatographiesäule eluieren. Die beiden anderen Proteine binden jedoch offensichtlich in einer Weise, die die Bindung von TNF- α an seinen Zelloberflächenrezeptor nicht beeinträchtigt.

- 5 Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse zur biologischen Wirkung des TNF-BP könnte es sich bei diesem Protein um den löslichen Teil des TNF-Rezeptors handeln.

Auf Grund seiner Fähigkeit, die biologische Wirkung von TNF- α und TNF- β zu inhibieren, ist das TNF bindende Protein geeignet, bei Indikationen eingesetzt zu werden, bei denen eine Herabsetzung der TNF-Aktivität im Organismus angezeigt ist.

- 10 TNF-BP kann zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers bei Indikationen, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF- α auftritt, eingesetzt werden. Solche Erkrankungen sind insbesondere entzündliche sowie infektiöse und parasitäre Erkrankungen oder Schockzustände, bei denen endogenes TNF- α freigesetzt wird. Es sind darunter auch pathologische Zustände zu verstehen, die als Nebenwirkungen bei der Therapie mit TNF- α , besonders bei hoher Dosierung, auftreten können, z. B. schwere Hypotension, Störungen des Zentralnervensystems. Als Arzneimittel kommen insbesondere pharmazeutische Zubereitungen für die parenterale Anwendung in Betracht, z. B. in Form von Lyophilisaten oder Lösungen, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch verträglichen Zusatzstoffen, wie Stabilisatoren. Auf Grund seiner TNF- α bindenden Eigenschaften ist TNF-BP auch als Diagnostikum für die Bestimmung von TNF- α geeignet, z. B. als eine der Komponenten in Radioimmunoassays oder Enzymimmunoassays, gegebenenfalls zusammen mit Antikörpern gegen TNF- α .

Auf Grund seiner Eigenschaften ist dieses Protein ein pharmakologisch wertvoller Wirkstoff, der aus natürlichen Quellen nicht in ausreichender Menge mittels proteinchemischer Methoden darstellbar ist.

- 15 Es bestand daher das Bedürfnis, dieses Protein (bzw. verwandte Proteine mit der Fähigkeit, TNF- α zu binden) auf rekombinantem Weg herzustellen, um es für die therapeutische Anwendung in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, DNAs, kodieren für Proteine mit der Fähigkeit, TNF- α zu binden, zur Verfügung zu stellen, um auf deren Basis die Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle zu ermöglichen, mit denen geeignete Wirtsorganismen transformiert werden können, um Proteine mit TNF-BP-Aktivität zu produzieren.

- 20 Die Aufgabe wurde erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß auf Basis der N-terminalen Aminosäuresequenz und Aminosäuresequenzen von tryptischen Peptiden, die vom hochgereinigten TNF-BP erhalten wurden, Hybridisierungssonden hergestellt wurden und mit Hilfe dieser Sonden aus einer geeigneten cDNA-Bibliothek eine cDNA, die einen Teil der für TNF-BP kodierenden DNA darstellt, erhalten wurde.

- 25 Eine solche DNA hybridisiert mit DNAs (bzw. RNAs), kodierend für TNF-BP bzw. verwandte Proteine mit der Fähigkeit, TNF- α zu binden, bzw. für Proteine, deren Prozessierung TNF-BP bzw. TNF-BP verwandte Proteine ergibt (im folgenden werden diese DNAs (bzw. RNAs) der Einfachheit halber als "TNF-BP-DNAs" bzw. "TNF-BP-RNAs" bezeichnet). Unter Prozessierung ist die in vivo Abspaltung von Teilsequenzen eines Proteins zu verstehen. Dabei kann N-terminal die Abspaltung einer Signal- und/oder anderen Sequenzen und gegebenenfalls zusätzlich, wenn es sich etwa bei dem Protein um den extrazellulären löslichen Teil eines Rezeptors handelt, der mit dem N-terminal gelegenen Abschnitt aus der Zellmembran herausragt, C-terminal die Abspaltung des die transmembrane und cytoplasmatische Region des Rezeptors bildenden Teils des Proteins erfolgen.

- 30 Unter TNF-BP-DNAs (bzw. TNF-BP-RNAs) sind auch cDNAs, abgeleitet von mRNAs, die durch alternatives Splicing entstanden sind (bzw. diese mRNAs selbst), mitumfaßt. Unter "alternativem" Splicing wird die Entfernung von Introns verstanden, bei der vom gleichen mRNA-Precursor verschiedene Spliceacceptor- und/oder Splicedonor-Stellen verwendet werden. Die dabei entstehenden mRNAs unterscheiden sich voneinander durch das gänzliche oder teilweise Vorhandensein oder Fehlen von bestimmten Exonsequenzen, wobei es gegebenenfalls zu einer Verschiebung des Leserasters kommen kann.

- 35 Gegenstand der Erfindung ist somit die in Anspruch 1 definierte DNA einschließlich sämtlicher Varianten davon, die geeignet sind, mit TNF-BP-DNAs bzw. TNF-BP-RNAs zu hybridisieren.

Die genannten Varianten umfassen z. B. diejenigen DNA-Moleküle, die durch PCR-Amplifikation mit Hilfe von Primern erhalten werden, deren Nukleotidsequenz nicht exakt mit der gesuchten Sequenz übereinstimmt, etwa aufgrund von zu Klonierungszwecken vorgesehenen Restriktionsschnittstellen oder aufgrund von bei der Aminosäuresequenzanalyse etwa nicht eindeutig ermittelten Aminosäuren.

- 40 Die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle können verwendet werden, um aus cDNA-Bibliotheken cDNA-Klone, enthaltend TNF-BP-DNAs, zu erhalten. Weiters können die erfindungsgemäßen DNAs als Hybridisierungssonden für mRNA-Präparationen eingesetzt werden, um TNF-BP-RNAs zu isolieren und daraus z. B. angereicherte cDNA-Bibliotheken herzustellen, die ein wesentlich vereinfachtes und effizienteres Screening ermöglichen. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Isolierung der gewünschten DNAs aus genomischen DNA-Bibliotheken mit Hilfe der erfindungsgemäßen DNAs als Hybridisierungssonden.

Gegenstand der Erfindung sind weiters TNF-BP-DNAs, die mit den vorgenannten DNA-Molekülen hybridisieren, einschließlich ihrer degenerierten Varianten sowie modifizierte TNF-BP-DNAs, kodierend für Proteine mit der Fähigkeit, TNF- α zu binden.

Gegenstand der Erfindung sind weiters rekombinante DNA-Moleküle, enthaltend solche DNA-Sequenzen.

- 45 Solche rekombinanten DNA-Moleküle sind zur Klonierung von DNA, kodierend für Proteine mit der Fähigkeit, TNF- α zu binden, sowie zu deren Expression in entsprechenden Wirtsorganismen geeignet.

Gegenstand der Erfindung sind weiters Polypeptide, die von solchen DNAs kodiert werden.

Aufgrund ihrer Fähigkeit, TNF- α zu binden, sind diese Polypeptide geeignet, bei der prophylaktischen und

therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers bei Indikationen eingesetzt zu werden, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF- α auftritt.

Da beim TNF-BP auch eine TNF- β inhibierende Wirkung nachgewiesen wurde, kann es (bzw. die verwandten Polypeptide) in geeigneter Dosierung, gegebenenfalls in im Hinblick auf eine gesteigerte Affinität zu TNF- β modifizierter Form, auch für die Inhibierung der Wirkung von TNF- β im Organismus verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung sind daher weiters pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend eine die biologische Wirkung von TNF- α und/oder TNF- β wirksam hemmende Menge von TNF-BP bzw. einem verwandten Polypeptid mit der Fähigkeit, TNF zu binden.

Unter "modifizierten DNAs" sind solche DNAs zu verstehen, die z. B. durch Mutation, Transposition oder Addition sowie durch Verkürzung von TNF-BP-DNAs erhalten werden, sofern diese modifizierten Sequenzen für Proteine mit der Fähigkeit, TNF- α zu binden, kodieren.

Unter der Fähigkeit, TNF- α zu binden" ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Eigenschaft eines Proteins zu verstehen, an TNF- α derart zu binden, daß die Bindung von TNF- α an den funktionellen Teil des Rezeptors verhindert und die Wirkung von TNF- α im menschlichen oder tierischen Organismus gehemmt oder aufgehoben wird. Durch diese Definition ist die Fähigkeit eines Proteins, auch an andere Proteine, z. B. an TNF- β , zu binden und deren Wirkung inhibieren zu können, mit eingeschlossen.

Ebenso wie etwaige Modifikationen der DNA-Sequenz erfolgt die Auswahl von für die Expression geeigneten Wirtsorganismen insbesondere im Hinblick auf diese biologische Eigenschaft; darüber hinaus gehen die bei der Herstellung rekombinanter Proteine üblichen Kriterien wie Verträglichkeit mit dem gewählten Vektor, Prozessierungsfähigkeit, Isolierung des Proteins, Expressionscharakteristika, Sicherheits- und Kostenaspekte in die Entscheidung über den Wirtsorganismus ein. Die Wahl eines geeigneten Vektors ergibt sich aus dem für die Transformation vorgesehenen Wirt. Grundsätzlich sind alle Vektoren geeignet, die die erfindungsgemäßen TNF-BP-DNAs replizieren und exprimieren.

Im Falle der TNF-BP-DNA ist im Hinblick auf deren Expression vor allem der etwaigen Relevanz der beiden beim natürlichen Protein festgestellten Kriterien Glykosylierung (vgl. Vorversuch 12) und hoher Anteil an Cysteinresten (vgl. Vorversuch 9) für die Eigenschaft, TNF- α zu binden, Rechnung zu tragen. Zweckmäßig werden daher für die Expression Eukaryoten, insbesondere geeignete Expressionssysteme höherer Eukaryoten, verwendet.

Das Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken mit Hilfe von Hybridisierungssonden, die von Aminosäuresequenzen kurzer Peptide abgeleitet sind, stößt auf Grund der Degeneration des genetischen Codes mitunter auf größere Schwierigkeiten. Zusätzlich erschwert wird diese Vorgangsweise dann, wenn von einem Protein, wie z. B. dem TNF-BP, nicht bekannt ist, in welchen Geweben es synthetisiert wird. In diesem Fall kann bei einem Versagen dieser Methode unter Umständen nicht mit Bestimmtheit festgestellt werden, ob es auf die Wahl einer ungeeigneten cDNA-Bibliothek oder auf die zu geringe Spezifität der Hybridisierungssonden zurückzuführen ist.

Zur Lösung der gestellten Aufgabe wurde daher erfindungsgemäß wie folgt vorgegangen: Als cDNA-Bibliothek wurde eine Bibliothek der Fibrosarkomzelllinie HS 913 T, die mit TNF- α induziert worden war und in Lambda gt11 vorlag, eingesetzt.

Um aus dieser Bibliothek Lambda DNA mit TNF-BP Sequenzen zu erhalten, wurde die große Empfindlichkeit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) ausgenutzt. Mit Hilfe dieser Methode kann aus einer gesamten cDNA-Bibliothek eine unbekannte DNA-Sequenz erhalten werden, die flankiert ist von Oligonukleotiden, die auf Basis bekannter Aminosäureteilstrecken entworfen und als Hybridisierungssonden eingesetzt wurden. Ein solches längeres DNA-Fragment kann nachfolgend als Hybridisierungssonde, z. B. zur Isolierung von cDNA-Klonen, insbesondere des ursprünglichen cDNA-Klons, eingesetzt werden.

Die "Polymerase Kettenreaktion" ("Polymerase Chain Reaction", PCR) ist eine Methode, um DNA enzymatisch in vitro zu amplifizieren. Die Methode basiert auf der Wiederholung eines Zyklus der drei Stufen: Hitzedenaturierung der DNA, Binden von Oligodesoxy-nukleotid-Primern an dazu komplementäre Sequenzen und Verlängerung der Primer mit DNA Polymerase, der aufeinanderfolgend unter kontrollierten Temperaturbedingungen mehrfach wiederholt wird. Für die PCR-Amplifizierung von DNA werden zwei Oligodesoxynukleotid-Primer eingesetzt, die das zu amplifizierende DNA-Segment flankieren. Diese Oligodesoxynukleotide sind so ausgelegt, daß sie an den gegenüberliegenden DNA-Strängen binden und so orientiert sind, daß die DNA-Synthese durch die Polymerase über die zwischen den Primern liegende Region erfolgt. Dadurch wird die Menge dieses DNA-Segments in jedem Zyklus verdoppelt, weil die verlängerten Produkte ebenfalls komplementär zu einem der Primer und damit befähigt sind, diesen zu binden. Dies führt zu einer exponentiellen Anhäufung des spezifischen, von den Primern flankierten DNA-Fragments. Der Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* ermöglicht die Automatisierung der PCR. Da dieses Enzym seine Aktivität auch nach längerer Inkubation bei hoher Temperatur (95°C) behält, die zur Denaturierung der DNA notwendig ist, genügt eine einmalige Zugabe des Enzyms für die Durchführung vieler PCR-Zyklen (31).

Im einzelnen wurde die gestellte Aufgabe wie folgt gelöst:

Vom hochgereinigten TNF- α bindenden Protein wurden die N-terminale Aminosäuresequenz sowie die Aminosäuresequenzen von durch tryptischen Verdau des Proteins erhaltenen Peptiden bestimmt.

Aus diesen Sequenzen wurden im Hinblick auf ihren Einsatz in der PCR für die Herstellung von Oligonukleotiden Bereiche einerseits aus dem N-Terminus und andererseits aus einem tryptischen Peptid derart ausgewählt, daß die Komplexität von Mischoligonukleotiden für die Hybridisierung mit cDNA möglichst gering ist. Auf Basis dieser beiden Bereiche wurde je ein Satz Mischoligonukleotide hergestellt, wobei der vom N-terminal gelegenen Bereich abgeleitete entsprechend der mRNA und der vom tryptischen Peptid abgeleitete revers komplementär zur mRNA synthetisiert wurde. Um das nachfolgende Klonieren eines mit PCR amplifizierten Segments zu

erleichtern, wurde der vom tryptischen Peptid abgeleitete Satz von Oligonukleotiden mit einer BamHI-Restriktionsstelle versehen. Darauf wurde Lambda-DNA aus der TNF- α induzierten Fibrosarkom cDNA-Bibliothek isoliert und daraus eine TNF-BP-Sequenz mittels PCR amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde kloniert und sequenziert; es weist 158 Nukleotide auf und enthält zwischen den beiden von den Primer Oligonukleotiden-

5 stammenden Sequenzabschnitten die für das tryptische Peptid 20 kodierende Sequenz.
Dieses DNA-Fragment kann nachfolgend radioaktiv markiert und als Sonde, z. B. zur Isolierung von cDNA-Klonen aus der Fibrosarkom-Bibliothek, verwendet werden. Dazu kann so vorgegangen werden, daß zunächst Plaques mit der Sonde hybridisiert, Phagen von hybridisierenden Plaques vereinzelt und daraus Lambda DNA gewonnen werden.

10 Daraufhin kann Einzelstrang-DNA mittels PCR hergestellt und direkt sequenziert werden. (Diese Methode kann verwendet werden, um auf schnellem Weg Sequenzinformationen von Inserts rekombinanter Lambda-Klone zu erhalten, ohne den üblichen Weg der Subklonierung von DNA-Fragmenten in M13 oder ähnlichen Vektoren beschreiben zu müssen.)

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Vorversuche und Beispiele näher erläutert:

15

Vorversuch 1

Kompetitionsbindungstest

20 Die Anwesenheit von TNF-BP wurde durch Konkurrenz mit der Bindung von radioaktiv markiertem rekombinantem TNF- α (125 I-TNF- α) an HL-60-Zellen überprüft. Zur radioaktiven Markierung mit 125 I-TNF- α wurde die Zwei-Phasen-Methode nach Tejedor und Ballesta verwendet (19). Dazu wurden 50 μ l Boratpuffer (50 mM, pH 8,4), 10 μ l KI (0,125 mM in freiem Boratpuffer) und 1 mCi 125 I (Amersham) mit 1 μ g rekombinantem TNF- α (hergestellt von Genentech enthaltend 36×10^6 E/mg, entsprechend 646 E/pMol), enthaltend 0,05% Tween 10, gemischt. Von der Voraussetzung ausgehend, daß sich markierter TNF- α von unmarkiertem hinsichtlich der Bindungseigenschaften nicht unterscheidet, wurde die spezifische Aktivität durch Verdrängungsanalyse be-

stimmt.
Zur Durchführung des Kompetitions-Bindungstests wurde ein Subklon von HL-60 Zellen (HL-60-10) (20, 21) verwendet.

30 Die Zellen wurden in Suspensionskultur in RPMI-1640 Medium mit 10% fötalem Rinderserum (FBS) gezüchtet. Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase ($7,5 \times 10^6$) wurden mit Bindungspuffer (RPMI-1640, 10% FBS, 20 mM Hepes pH 7,4) gewaschen und mit 50 mM 125 I-TNF- α 2 Stunden lang bei 4°C durch Rotation in 1,5 ml Eppendorf Zentrifugenröhrchen in einem Gesamtvolumen von 300 μ l inkubiert. Anschließend wurde 10 Sekunden lang bei 8000 xg zentrifugiert, der Niederschlag mit eiskaltem Bindungspuffer aufgenommen und

35 zweimal gewaschen, um freien von membrangebundenem 125 I-TNF zu trennen.
Die Radioaktivität wurde mit einem gamma-Zähler (LKB 1272 Clinigamma) gemessen. Die spezifische Bindung wurde definiert als Differenz zwischen Gesamtbindung und unspezifischer Bindung, die bei 1000fachem Überschuß von unmarkiertem TNF- α auftrat (die unspezifische Bindung betrug 5–20% der Gesamtbindung). Anschließend wurde der Einfluß von dialysiertem Urin auf die Bindung von 125 I-TNF- α gemessen.

40 Die Bindungshemmung verursacht durch verschiedene Volumina eines konzentrierten Dialyseharns (der verwendete Ausgangsharn wurde mit EDTA (10 g/l), TRIS (6 g/l), NaN_3 (1 g/l), Benzamidinhydrochlorid (1 g/l) konserviert, gegen 0,15 M NaCl, 5 mM Hepes, pH 7,4, und 1 mM Benzamidinhydrochlorid dialysiert und bei –20°C gelagert), wurde zur Konstruktion einer Standardkurve herangezogen, wobei das Urinvolumen gegen das Verhältnis von gebundenem 125 I-TNF- α zu maximal gebundenem 125 I-TNF- α (B/Bmax) aufgetragen wurde.
45 Eine Einheit TNF bindendes Protein wurde definiert als diejenige Menge von TNF-BP, die das Verhältnis B/Bmax auf 0,5 herabsetzt.

Um eine Verringerung der Bindung von 125 I-TNF- α an die Zellen durch eventuell in der Probe vorhandenen TNF- α oder TNF- β zu verhindern, mußten diese entfernt bzw. blockiert werden.

Dazu wurden Antisera verwendet, die durch Immunisierung von Kaninchen mit TNF- α bzw. TNF- β hergestellt worden waren. Das Immunglobulin von 1 μ l TNF- α -Antiserum wurde an 25 mg Protein-A-Sepharose (Pharmacia) in 200 μ l Bindungspuffer bei 37°C eine Stunde lang adsorbiert. Um eventuell in den biologischen Proben enthaltenes TNF- α zu entfernen, wurden diese mit dem an Protein A-Sepharose gebundenen Anti-TNF- α 12 Stunden lang bei 4°C in einem Volumen von 750 μ l unter Rotation inkubiert. Nach anschließender 5minütiger Zentrifugation bei 10 000 xg wurde der Überstand für den Kompetitionsbindungstest verwendet.

55 In einem Vergleichsversuch konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe dieser Vorgangsweise die Konkurrenz durch 10 nM exogenen rekombinanten TNF- α vollständig aufgehoben wird.

Dazu wurden verschiedene Konzentrationen von TNF- α (1–100 nM) in 7 μ l Bindungspuffer mit 1 μ l anti TNF- α , adsorbiert an 25 mg Protein A-Sepharose, 12 Stunden lang bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Überstände dem Kompetitionsbindungstest unterworfen. Die Ergebnisse dieses Vergleichsversuches sind in Fig. 2a dargestellt: Die Werte, erhalten nach Präinkubation mit Anti-TNF- α (● — — — ●), wurden verglichen mit den entsprechenden Werten für TNF- α , das nicht vorinkubiert worden war (○ — — — ○). Die Ergebnisse zeigen, daß die Verringerung der Bindung von 125 I-TNF- α durch 10 nM TNF- α ausgeschaltet werden kann, wenn TNF- α mit Antikörpern präinkubiert wird.

Da Antikörper gegen TNF- β keine Bindung an 125 I-TNF- α zeigten, konnten sie direkt zur biologischen Probe zugegeben werden. Es wurden 10 μ l Antiserum mit der Probe gemischt, eine Stunde inkubiert und anschließend der Kompetitionsassay durchgeführt.

In einem Vergleichsversuch konnte gezeigt werden, daß durch Zugabe von Anti-TNF- β die durch 100 nM exogenen rekombinanten (hergestellt von Genentech, enthaltend 230×10^6 E/mg entsprechend 3,96 E/pMol

TNF- β verursachte Hemmung der Bindung aufgehoben wird. Dazu wurden den Vergleichsproben mit konstanter TNF- β -Konzentration verschiedene Mengen Anti-TNF- β (1,25 – 20 μ l) zugesetzt. Nach 60minütiger Inkubation wurden die Mischungen dem Kompetitionsbindungstest unterworfen. Fig. 2b zeigt, daß 10 μ l Anti-TNF- β die durch TNF- β 100 nM verursachte Bindungshemmung vollständig aufhebt.

Die Ergebnisse der Kompetitions-Bindungsversuche sind in Fig. 1 dargestellt: Die Bindung von 50 pM 125 I-TNF- α bei 4°C in Gegenwart von 20fach konzentriertem Dialyseharn ist durch den Verlauf der Kurve ● — — ● dargestellt (die Balken zeigen den Standardfehler des arithmetischen Mittels an).

Daß die gemessene Verringerung der Bindung von 125 I-TNF- α an die Zelle nicht auf die Anwesenheit von TNF- α oder TNF- β in der Probe zurückzuführen ist, zeigt der identische Kurvenverlauf bei Proben mit vorangegangener Behandlung mit TNF- α -Antikörpern, gebunden an Protein-A-Sepharose (○ — — ○), bzw. unter Zugabe von 10 μ l TNF- β -Antiserum (□ — — □).

Vorversuch 2

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob TNF-BP Affinität zu TNF- β aufweist. Dazu wurde wie in Vorversuch 1 vorgegangen mit dem Unterschied, daß die Zellen mit 50 pM 125 I-TNF- β inkubiert wurden. Es wurde festgestellt, daß TNF-BP zu TNF- β eine Affinität aufweist, die ca. 1/50 seiner Affinität zu TNF- α beträgt; d. h. es werden 50 Einheiten TNF-BP benötigt, um die Bindung von TNF- β an die Zelle um 50% zu inhibieren.

Vorversuch 3

Nachweis der Bildung eines Komplexes von TNF- α mit TNF-BP aus biologischen Flüssigkeiten

Diese Versuche wurden mit einer Mischung von 125 I-TNF- α mit dialysiertem Harn oder Serum mittels Gelchromatographie aus Sephacryl durchgeführt. Dazu wurden Mischungen mit und ohne 250fachen molaren Überschuß von nichtmarkiertem TNF- α hergestellt.

500 μ l Probe wurden 10 Minuten lang bei 23°C mit 125 I-TNF- α bei einer Endkonzentration von 200 pM gemischt und auf einer Sephacryl 200 superfine Säule (1,5 \times 60 cm, Pharmacia), die mit 0,15 M NaCl, 5 mM Hepes pH 7,4 equilibriert worden war, aufgetragen. Die Säule wurde mit 0,15 M NaCl, 5 mM Hepes pH 7,4 bei einer Durchflußrate von 25 ml/h eluiert. Vor der Gelchromatographie wurden ein Teil der Proben zusätzlich mit einem 250fachen molaren Überschuß von unmarkiertem TNF- α (50 nM) inkubiert.

Fig. 3A zeigt das Chromatogramm von 125 I-TNF- α allein (□ — — □) und einer Mischung von 200 pM 125 I-TNF- α mit dialysiertem Harn einer gesunden Person (● — — ●).

Fig. 3B zeigt die Elutionsprofile von Mischungen von 200 pM 125 I-TNF- α mit dialysiertem Harn von einem Urämiepatienten in Abwesenheit (● — — ●) und Anwesenheit (○ — — ○) eines 250fachen Überschusses von unmarkiertem TNF- α .

Fig. 3C zeigt die Elutionsprofile von Mischungen von 200 pM 125 I-TNF- α mit Serum einer gesunden Person in Abwesenheit (● — — ●) und Anwesenheit (○ — — ○) eines 250fachen Überschusses von unmarkiertem TNF- α .

Fig. 3D zeigt die Elutionsprofile von Mischungen von 200 pM 125 I-TNF- α mit Serum von einem Urämiepatienten in Abwesenheit (● — — ●) und Anwesenheit (○ — — ○) eines 250fachen Überschusses von unmarkiertem TNF- α . Pfeile bedeuten das Totvolumen V_0 und die Elutionsvolumina von Rinderserumalbumin (I; Molekulargewicht 67 000), Ovalbumin (II; 43 000), Chymotrypsinogen (III; 25 000) und Ribonuklease (IV; 13 700).

Bei Verwendung von dialysiertem Harn einer gesunden Person eluierte 125 I-TNF- α als einzelner Peak entsprechend einem Molekulargewicht von ca. 35 000 (Fig. 3A); die Verwendung von Dialyseharn eines Urämiepatienten, Serum einer gesunden Person und Serum eines Urämiepatienten resultierte in zwei Hauptpeaks, entsprechend Molekulargewichten von ca. 35 000 (freier 125 I-TNF- α) und ca. 75 000 (Komplex zwischen 125 I-TNF- α und TNF-BP).

Vorversuch 4

Partielle Reinigung von TNF-BP

TNF-BP wurde aus mehreren Proben Dialyseharn von Urämiepatienten partiell gereinigt.

a) Konzentration

Dazu wurden jeweils 300 ml Harn durch Druckultrafiltration (Diaflo-Zellen, ausgerüstet mit UM-10-Membranen (Amicon Inc.) und anschließende Dialyse gegen 10 mM Tris HCl, pH 8,0, 0,3% Natriumazid konzentriert.

b) Ionenaustauschchromatographie

Zur Durchführung der Ionenaustauschchromatographie wurde eine DEAE-Sephacel-Säule (1,5 \times 60 cm, Pharmacia) mit der Probe (15 ml konzentrierter Dialyseharn enthaltend 192 E/ml TNF-BP) beschickt. Eluiert wurde mit 150 ml eines NaCl/10 mM Tris/HCl, pH 8,0-Gradienten, wobei die NaCl-Konzentration 0 bis 0,4 M betrug. Der am Ende der Elution verwendete steile Gradient diente zur Überprüfung, ob zusätzliches TNF-BP bei hoher

Ionenstärke eluierbar ist. Die das TNF bindende Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert, wiederaufgenommen und gegen 0,15 M NaCl, 5 mM Hepes pH 7,4 dialysiert. Das Ionenaustausch-Chromatogramm ist in Fig. 4A dargestellt (um die Werte für die Absorption zu erhalten, sind die dargestellten Werte mit 0,3 zu multiplizieren).

5

c) Gelpermeationschromatographie

Die aus Schritt b) erhaltene Proteinlösung (5 ml, enthaltend 375 E/ml TNF-BP) wurde auf eine Sephadex G-75 superfine Säule (2,6 × 90 cm, Pharmacia), equilibriert mit 0,15 M NaCl, 5 mM Hepes, pH 7,4, aufgetragen. Die Säule wurde bei einer Durchflußrate von 7 ml/Stunde eluiert. Das Chromatogramm ist in Fig. 4B dargestellt; die Pfeile zeigen das Totvolumen (V_0), die Elutionsvolumina von Rinderserumalbumin (I, Molekulargewicht 67 000), Ovalbumin (II, 43 000) und Chymotrypsinogen (III, 25 000) an (um die Werte für die Absorption zu erhalten, sind die dargestellten Werte mit 0,03 zu multiplizieren).

Die TNF-BP enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert, wieder aufgenommen, gegen 0,12 M NaCl, 5 mM Hepes pH 7,4 dialysiert und durch Filtration sterilisiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Biorad Protein Microassay und mit Albumin als Standard.

Die partielle Reinigung brachte eine 62fache Anreicherung des TNF bindenden Proteins, das Molekulargewicht wurde mit ca. 50 000 bestimmt.

20

Vorversuch 5

Hemmung der biologischen Aktivität von rekombinantem TNF durch TNF-BP

Die Blockierung der wachstumshemmenden Wirkung von TNF- α durch TNF-BP wurde an HL-60-10 Zellen in Agarkultur gemessen. 2000 Zellen wurden in 1 ml 0,3%igem Agar auf 0,5%igem Agar, jeweils in Wachstumsmedium mit 10% fötalem Rinderserum, in 35 mm Gewebekulturschalen geschichtet; die Topagarschicht der Kulturschalen enthielt verschiedene Konzentrationen von TNF- α (0–4 pM, ausgehend von Stammlösungen, enthaltend 80 pM oder 320 pM TNF- α in Wachstumsmedium) und eine einheitliche Konzentration von TNF-BP (13 E/ml, ausgehend von einer Stammlösung enthaltend 100 E/ml in 0,15 M NaCl, 5 mM Hepes, pH 7,4). Die Kolonien wurden nach 10 Tagen gezählt.

Fig. 5A zeigt die Blockierung der Wachstumshemmung von rekombinantem TNF- α durch TNF-BP in Agarkultur: ● — — — ● TNF- α allein; ○ — — — ○ TNF- α mit Zusatz von 13 E/ml TNF-BP. TNF-BP allein beeinträchtigt das Zellwachstum nicht.

Die Ergebnisse von Versuchen mit unterschiedlichen TNF-BP-Konzentrationen (0,4–27 E/ml; Stammlösungen 1000, 250, 62 und 16 E/ml) bei konstanter Konzentration von TNF- α (2 pM; Stammlösung 80 pM) sind in Fig. 5B dargestellt (Balken bedeuten jeweils die Standardabweichung des arithmetischen Mittels). Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen den dosisabhängigen Effekt des TNF-BP auf die biologische Wirkung von TNF- α .

40

Vorversuch 6

Bindungsverhalten von Zellen nach Vorbehandlung mit TNF-BP

$7,5 \times 10^6$ HL-60-10 Zellen in 300 ml RPMI, 10% FBS, 20 mM Hepes pH 7,4 wurden 20 min lang bei 37°C mit TNF-BP (14 E/ml) inkubiert, danach zweimal mit eiskaltem Bindungspuffer gewaschen. Danach wurde der Kompetitionsbindungstest mit 125 I-TNF- α , wie im Beispiel 1 angegeben, durchgeführt; die Kontrollversuche wurden mit unbehandelten Zellen durchgeführt.

Es wurde ein durchschnittliches Verhältnis B/B_{max} von 0,95 erhalten. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Wirkung des TNF-BP nicht auf seiner etwaigen Bindung an die Zellen beruht.

50

Vorversuch 7

Herstellung von hochgereinigtem TNF-BP

a) Konzentration des Harns

55

200 l Dialyseharn von Urämiepatienten, aufbewahrt in Flaschen enthaltend EDTA (10 g/l), Tris (6 g/l), Na₃ (1 g/l) und Benzamidinhydrochlorid (1 g/l) sowie kühl gelagert, wurden durch Ultrafiltration mittels einem hochdurchlässigen Hämodialysator mit einer asymmetrischen Hohlfasermembran (FH 88H, Gambro) auf 4,2 l mit einem Proteingehalt von 567 g konzentriert. Der konzentrierte Harn wurde gegen 10 mM/l Tris HCl, pH 8 dialysiert. Während dieses Vorgangs wurde, wie in den nachfolgenden Schritten (außer bei der Reverse Phase Chromatographie), 1 mM/l Benzamidinhydrochlorid zugefügt, um proteolytischen Verdau entgegenzuwirken. Alle nachfolgenden Reinigungsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C durchgeführt.

65

b) Ionenaustauschchromatographie

Dieser Schritt wurde, wie im Vorversuch 1 beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden DEAE-Sephacel-Säulen (2,5 × 40 cm) mit Proben konzentrierten und dialysierten Harns, enthaltend je ca. 75 g Protein, beschickt. Eluiert wurde mit 800 ml eines NaCl/10 mM Tris/HCl pH-8-Gradienten, wobei die NaCl-Konzentration 0 bis 0,4 M

betrug. Die das TNF-BP enthaltenden Fraktionen von sieben Säulen mit einem Gesamtproteingehalt von 114 g wurden bei -20°C gelagert.

c) Affinitätschromatographie

Zur Herstellung der TNF-Sepharosesäule wurde rTNF- α (15 mg) in 0,1 M NaHCO_3 , 1 M NaCl, pH 9 (Kopplungspuffer) an 1,5 g cyanogenbromidaktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) gekoppelt. Die Sepharose wurde in 1 mM HCl gequollen und mit Kopplungspuffer gewaschen. Nach Zusatz von rTNF- α wurde die Suspension 2 Stunden lang bei Raumtemperatur rotieren gelassen. Der Überschuß an CNBr-Gruppen wurde durch eineinhalbstündige Rotation mit 1 M Ethanolamin, pH 8 blockiert. Die TNF-Sepharose wurde einige Male abwechselnd in 1 M NaCl, 0,1 M Natriumacetat pH 8 und 1 M NaCl, 0,1 M Borsäure pH 4 gewaschen und anschließend in phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit 1 mM Benzamidinhydrochlorid gelagert. Die aus Schritt b) erhaltenen Fraktionen wurden auf eine Konzentration von 0,2 M NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8 eingestellt. Die TNF-Sepharose wurde in eine Säule gepackt und mit 0,2 M NaCl, 10 mM Tris HCl, pH 8 gewaschen und die TNF-BP enthaltenden Fraktionen, entsprechend ca. 30 g Protein, bei einer Durchflußrate von 10 ml/h aufgetragen und ausgiebig mit 0,2 M NaCl, 10 mM Tris HCl, pH 8 gewaschen, bis im Eluat bei 280 nm keine Absorption mehr nachweisbar war. Anschließend wurde TNF-BP mit 0,2 M Glycin/HCl, pH 2,5 eluiert.

Der Verlauf der Affinitätschromatographie ist in Fig. 6 dargestellt: $\bigcirc - - - \bigcirc$ Absorption bei 280 nm; $\bullet - - - \bullet$ TNF-BP, gemessen im Kompetitionsbindungstest.

TNF-BP enthaltende Fraktionen aus 4 Auftrennungen wurden vereinigt und nach Zusatz von Polyethylenglykol (MG 6000) — bis zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml — lyophilisiert. Die lyophilisierte Probe wurde in destilliertem Wasser gelöst und gegen destilliertes Wasser dialysiert. (Die dialysierte Probe (4 ml) wurde in tiefgefrorenem Zustand gelagert.)

Dieser Reinigungsschritt brachte gegenüber dem vorangegangenen eine weitere Anreicherung um das ca. 9000fache. (Der Reinigungsgrad in diesem Schritt konnte nicht exakt bestimmt werden, weil ein gewisser Anteil von TNF- α aus der Säule auslief und dabei möglicherweise einen Teil des TNF-BP maskierte; eine derartige Maskierung hat zwangsläufig eine Ungenauigkeit bei der quantitativen Bestimmung der Aktivität des Proteins zur Folge.) SDS-PAGE (durchgeführt, wie in Vorversuch 8 beschrieben) der TNF-BP enthaltenden Fraktionen zeigte die Elution von drei Hauptkomponenten mit Molekulargewichten von 28 000, 30 000 und 50 000 (Fig. 8, Spur A).

d) Reverse Phase Chromatographie

Ein aliquoter Anteil (1 ml) der aus Schritt c) erhaltenen Fraktionen mit einem Zusatz von 0,1% Trifluoressigsäure wurde auf eine ProRPC HR 5/10 Säule (Pharmacia), die an ein FPLC-System (Pharmacia) angeschlossen war, aufgetragen. Die Säule wurde mit 0,1%iger Trifluoressigsäure equilibriert und bei Raumtemperatur mit einem linearen 15 ml Gradienten von 10 Vol.-% bis 50 Vol.-% Acetonitril, enthaltend 0,1% Trifluoressigsäure, beschickt; die Durchflußrate betrug 0,3 ml/min. Fraktionen von 0,5 ml wurden gesammelt und die Absorption bei 280 nm sowie die Aktivität des TNF- α bindenden Proteins mit Hilfe des Kompetitionsbindungstest, wie im Beispiel 1 angegeben, bestimmt, wobei jeweils 0,01 μl Probe verwendet wurden. TNF-BP eluierte als ein einziger Aktivitätspeak entsprechend einem scharfen UV-Absorptionspeak. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Fig. 7 dargestellt.

Dieser letzte Reinigungsschritt brachte eine Zunahme der spezifischen Aktivität um das ca. 29fache, die Gesamtzunahme an Aktivität gegenüber dem Ausgangsmaterial (konzentrierter Dialysat) betrug das ca. $1,1 \times 10^6$ fache.

SDS-PAGE der reduzierten und nicht reduzierten Probe, durchgeführt wie in Vorversuch 8 angegeben, zeigte das Vorhandensein eines einzigen Polypeptids mit einem Molekulargewicht von ca. 30 000 (Fig. 8, Spuren B, C).

Vorversuch 8

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (25) auf 18 cm langen, 16 cm breiten und 1,5 mm dicken Flachgelen mit 10 Taschen mittels einer LKB 2001 Elektrophorese-Einheit durchgeführt. Der Proteingehalt der Proben aus den Reinigungsschritten c) und d) (Vorversuch 7) wurde mittels Bio-Rad Protein Assay bestimmt bzw. aus der Absorption bei 280 nm berechnet, wobei einer Absorption von 1,0 ein Gehalt von 1 mg TNF-BP/ml 000 000dnet wurde.

Die Proben, enthaltend ca. 25 μg Protein (aus Vorversuch 7c) bzw. ca. 5 μg (aus 7d) in reduzierter (β -Mercaptoethanol) und nicht reduzierter Form wurden auf ein 3%iges Sammelgel und ein 5- bis 20%iges lineares Polyacrylamidgradientengel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 25 mA/Gel ohne Kühlung gefahren. Als Molekulargewichtsmarker (Pharmacia) wurden Phosphorylase B (MG 94 000), Rinderserumalbumin (MG 67 000), Ovalbumin (MG 43 000), Karboanhydrase (MG 30 000), Sojabohnen-Trypsininhibitor (MG 20 100) und α -Laktalbumin (MG 14 400) verwendet. Die Gele wurden mit Coomassie Blue in 7%iger Essigsäure/40%igem Ethanol gefärbt und in 7%iger Essigsäure/25%igem Ethanol entfärbt.

Das Ergebnis der SDS-PAGE ist in Fig. 8 abgebildet: Spur A (Affinitätschromatographie): Es wurden 3 Proteine mit Molekulargewichten von ca. 28 000, ca. 30 000 und ca. 50 000 nachgewiesen.

Spuren B und C (Reverse Phase Chromatographie): Elektropherogramme des reduzierten (B) und des nicht reduzierten (C) hochgereinigten Proteins.

Das Ergebnis der SDS-PAGE zeigt, daß TNF-BP aus einer einzigen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 30 000 besteht. (Der Unterschied zwischen diesem Molekulargewicht und dem mittels Gelpermeationschromatographie auf Sephadex G-75 ermittelten Molekulargewicht von ca. 50 000 könnte damit erklärt werden, daß bei der Gelpermeationschromatographie auf Grund der Molekülform des Proteins ein höheres Molekulargewicht vorgetäuscht wird. Eine weitere Möglichkeit für die Erklärung dieser Diskrepanz könnte die Bildung von TNF-BP-Dimeren unter nicht denaturierenden Bedingungen sein.)

Vorversuch 9

Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalyse wurde mit dem Beckman High Performance Analyzer System 6300 nach Standardvorschrift durchgeführt.

Sie ergab folgende Aminosäurezusammensetzung, angegeben in Mol Aminosäure pro Mol Protein und in Mol-% Aminosäure, bestimmt als Mittelwert einer 24- und einer 48stündigen Hydrolyse:

	Mol Aminosäure/ Mol Protein	Mol-% Aminosäure
Asp + Asn	27,5	10,9
Thr	15,8	6,3
Ser	20,7	8,2
Glu + Gln	35,0	13,8
Pro	9,5	3,8
Gly	16,0	6,3
Ala	4,2	1,7
Cys	32,3	12,8
Val	10,8	4,3
Met	1,1	0,4
Ile	7,0	2,8
Leu	20,2	8,0
Tyr	6,1	2,4
Phe	8,1	3,2
His	11,1	4,4
Lys	15,7	6,2
Arg	11,8	4,7
Total	252,9	100

Weiters wurde in den Proben Glukosamin nachgewiesen.

Vorversuch 10

a) Probenvorbereitung

15 µg des nach Vorversuch 7d) gereinigten Proteins wurden über Reverse Phase HPLC entsalzt und weiter gereinigt. Dazu wurden eine Bakerbond WP C18-Säule (Baker; 4,6 x 250 mm) und 0,1%ige Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet. Die Gradientensteigerung betrug 20 bis 68% Eluens B in 24 min. Die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm und bei 280 nm. Die TNF-BP enthaltende Fraktion wurde gesammelt, getrocknet und in 75 µl 70%iger Ameisensäure gelöst und direkt für die Aminosäuresequenzanalyse verwendet.

b) Aminosäuresequenzanalyse

Die automatische Aminosäuresequenzanalyse wurde mit einem Applied Biosystem 477 A Flüssigphasensequenator durch On-line-Bestimmung der freigesetzten Phenylthiohydantoin-Derivate mittels Applied Biosysteme Analysator, Modell 120 A PTH, durchgeführt. Sie ergab die folgende N-terminale-Sequenz als Hauptsequenz: (ca. 80% der Proteinmenge):

Asp-Ser-Val-X-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-

Daneben war folgende Nebensequenz nachzuweisen:

Leu-(Val)-(Pro)-(His)-Leu-Gly-X-Arg-Glu-

(Die in Klammer stehenden Aminosäuren konnten nicht eindeutig identifiziert werden.)

Vorversuch 11

SDS-PAGE

Die Probenvorbereitung wurde wie im Vorversuch 10 durchgeführt mit dem Unterschied, daß die Probenmenge 10 µg betrug. Die Probe wurde in 50 µl Wasser aufgenommen und in 4 Portionen geteilt. Einer der vier aliquoten Teile wurde zur Reinheitsbestimmung mittels SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (25) mit DTT (Dithiothreitol) reduziert und auf Minigelen (Höfer, 55 x 80 x 0,75, 15%) getrennt; als Molekulargewichtsmarker wurde der im Vorversuch 8 angegebene verwendet. Die Färbung erfolgte nach der Methode von Oakley (30). Das Elektropherogramm ist in Fig. 9 dargestellt. Es zeigt eine einzige Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 30 000.

Vorversuch 12

Untersuchung auf Zuckeranteile mittels Affinoblotting

Dazu wurden zwei der restlichen Portionen aus der Probenvorbereitung zu Vorversuch 11 gelelektrophoretisch (36) aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet.

Der Transfer auf Nitrocellulose (NC, Porenweite 0,45 µm) erfolgte mit einer Semi-dry Apparatur Sartorius SM 17 556) während 2 h bei einer Stromstärke von 1,1 mA/cm² Gelfläche. Anschließend an den Blot-Vorgang wurde die NC für 1 h in Blockingpuffer (1% BSA in PBS, pH 7,2) bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,2 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2).

Die Färbung der Glykoproteine erfolgte mit zwei verschiedenen Lectinen, die sich durch ihre Spezifität für die Zuckerreste unterscheiden: Concanavalin A (ConA) reagiert mit Glucose und Mannose, und Weizenkeimlectin (WGA) reagiert mit N-Acetylglucosamin und N-Acetylneuraminsäure. WGA wurde mittels Glutardialdehyd mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt.

Zur Kontrolle wurden für jedes Lectin jeweils Kontrollproteine mit bekannter Glykanstruktur mit aufgetragen (Con A: Ovalbumin; WGA: Fetuin).

Die Entwicklung mit ConA wurde wie folgt ausgeführt:

- einige Male spülen mit TBS (500 mM NaCl, 20 mM TRIS, pH 7,4),
- 60 min Inkubation mit ConA (25 mg ConA/ml) in TBSK (TBS mit 1 mM MnCl₂ und 1 mM CaCl₂),
- 4 x 15 min spülen in TBSK mit 0,1% TWEEN 20,
- 60 min Inkubation mit Peroxidase (50 mg/ml in TBSK),
- 4 x 15 min spülen in TBSK mit 0,1% TWEEN 20,
- 15 min Inkubation in TBS,
- Inkubation im Färbemedium (60 mg 4-Chloro-1-naphthol, 15 ml Methanol, 85 ml TBS, 60 ml H₂O₂), bis blaue Banden sichtbar werden.
- Die Färbung wurde durch Spülen mit Wasser beendet.

Die Entwicklung mit WGA/Peroxidase wurde wie folgt ausgeführt:

- einige Male spülen mit TBS,
- Inkubation mit Lectin-Konjugat (20 ml/ml in PBS) für 2 h,
- einige Male spülen mit TBS,
- 15 min Inkubation in TBS,
- Inkubation mit Färbemedium (vgl. oben), bis blaue Banden sichtbar werden.

Das Ergebnis des Affinoblots ist in Fig. 10 dargestellt:

Die Spuren 1 (Kontrolle) und 2 zeigen die Reaktion mit ConA, die Spuren 3 (Kontrolle) und 4 zeigen die Reaktion mit WGA.

Das Ergebnis des Affinoblots zeigt, daß es sich bei TNF-BP um ein Glykoprotein handelt.

Vorversuch 13

Einfluß von TNF-BP auf die zytotoxische Wirkung von TNF-α

Die Bestimmung des zytotoxischen Effekts von TNF-α auf WEHI 164 Klon 13 Zellen wurde durchgeführt, wie in (29) beschrieben. Zielzellen wurden auf Mikrotiterplatten mit einer Konzentration von 20 000 bis 40 000 Zellen pro Vertiefung in 100 µl RPMI Gewebekulturmedium mit 10% FBS aufgebracht. TNF-α wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen (100 pM/l, 1000 pM/l) zusammen mit verschiedenen Konzentrationen von hochgereinigtem TNF-BP zugefügt. Nach 20 h wurde der Anteil an toten Zellen, wie in (29) beschrieben, bestimmt. Die Titrationskurven dieses Versuchs sind in Fig. 11 dargestellt (● — — — ●: 100 pM TNF-α; ○ — — — ○: 1000 pM TNF-α).

Beispiel 1

a) Tryptic Peptide Mapping

Etwa 60 µg des nach Vorversuch 7d) gereinigten Proteins wurden über Reverse Phase HPLC entsalzt und damit weiter gereinigt. Dazu wurden eine Bakerbond WP C18 Säule (Baker; 4,6 x 250 mm) und 0,1%ige Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet. Die Gradientenstei-

gerung betrug 20 bis 68% Eluens B in 24 min. Die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm und bei 280 nm. Die TNF-BP enthaltende Fraktion (Retentionszeit etwa 13,0 min) wurde gesammelt, getrocknet und in 60 µl 1%igem Ammoniumbicarbonat gelöst.

- 5 Dieser Lösung wurden 1% w/w, entsprechend 0,6 µg Trypsin (Boehringer Mannheim) zugesetzt und die Reaktionsmischung 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden nochmals 1% w/w Trypsin zugesetzt und die Inkubation über Nacht fortgesetzt.

Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde der Reaktionsansatz anschließend mit 60 µl 6 M Harnstoff und mit 12 µl 0,5 M Dithiothreitol versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen.

- 10 Die Auftrennung der entstandenen tryptischen Spaltpeptide erfolgte über Reverse Phase HPLC, wobei eine Delta Pak C18 Säule (Waters, 3,9 x 150 mm, 5 µm Teilchendurchmesser, 100 Å Porendurchmesser) bei 30°C und 0,1%ige Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet wurden. Die Gradientensteigerung betrug 0 bis 55% Eluens B in 55 min, danach wurde 55% B für 15 min beibehalten. Die Flußrate betrug 1 ml/min, die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm (0,5 AUFS) und bei 280 nm (0,05 AUFS).

15

b) Sequenzanalyse von tryptischen Peptiden

- Einige der nach a) gewonnenen tryptischen Spaltpeptide von TNF-BP wurden der automatischen Aminosäuresequenzanalyse unterworfen. Dazu wurden die entsprechenden Fraktionen aus der Reverse Phase HPLC
20 gesammelt, getrocknet und in 75 µl 70%iger Ameisensäure gelöst. Diese Lösungen wurden direkt für die Sequenzierung in einem Applied Biosystems 477 A Pulsed Liquid Phase Sequenator eingesetzt. Tab. 1 enthält die Ergebnisse der Sequenzanalyse der tryptischen Peptide, wobei die in Klammern angeführten Aminosäuren nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden konnten. Die Angabe "X" bedeutet, daß an dieser Stelle die Aminosäure nicht identifiziert werden konnte. In der Fraktion 8 konnte die Aminosäure in Position 6 nicht identifiziert
25 werden. Die Sequenz -X-N-S- für die Position 6-8 läßt vermuten, daß die Aminosäure 6 in glykosylierter Form vorliegt.

- Auffallend ist die weitgehende Identität der Sequenz der nur in geringer Menge auftretenden Fraktion 12 mit der in Vorversuch 10 bestimmten Nebensequenz des N-Terminus. Da die Proteine der Haupt- und Nebensequenz auf einer analytischen Reverse Phase HPLC-Säule (Vorversuch 10a) nicht trennbar waren, könnte es sich
30 bei dem Protein mit der Nebensequenz um eine am N-Terminus verlängerte Form des TNF-BP handeln, die durch Prozessierung zum Großteil in das Protein mit der Hauptsequenz überführt wird.

Fraktion	Aminosäuresequenz
35 1	D - S - V - C - P - Q - G - K
2	X - X - L - S - (C) - S - K
5	E - N - E - (C) - V - S - (C) - (S) - N - (C) - K - (K)
8	Y - I - H - P - Q - X - N - S - I - X - X - K
11	E - C - E - S - G - S - F - T - A - S - E - N - (N) - (K)
40 12	L - V - P - H - L - G - D - R
14/I	G - T - Y - L - Y - N - D - C - P - G - P - G - Q -
14/II	(E) - M - G - Q - V - (E) - (I) - (S) - X - X - X - (V) - (D) -
20	G - T - Y - L - Y - N - D - C - P - G - P - G - Q - D - T - X - X - R
45 26	Q - N - T - V - (C) - T - X - (H) - A - G - F - (F) - L - (R)
27	S - L - E - (C) - T - K - L - (C) - L - P - Q - I - E - N -

- (Um die Beschreibung der nachfolgenden Beispiele zu vereinfachen, werden oft wiederkehrende Methoden bzw. Bezeichnungen kurz beschrieben.)

- "Schneiden" oder "Verdauen" von DNA bezieht sich auf die katalytische Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzymen) an für diese spezifischen Stellen (Restriktionsstellen). Restriktionsendonukleasen sind käuflich erhältlich und werden unter den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen (Puffer, Rinderserumalbumin (BSA) als Trägerprotein, Dithiothreitol (DTT) als Oxidationsschutz) eingesetzt.
55 Restriktionsendonukleasen werden mit einem Großbuchstaben, meist gefolgt von Kleinbuchstaben und normalerweise einer römischen Ziffer, bezeichnet. Die Buchstaben hängen von dem Mikroorganismus ab, aus dem die betreffende Restriktionsendonuklease isoliert wurde (z. B.: Sma I: *Serratia marcescens*). Üblicherweise wird etwa 1 µg DNA mit einer oder mehreren Einheiten des Enzyms in etwa 20 µl Pufferlösung geschnitten. Normalerweise wird eine Inkubationsdauer von 1 Stunde bei 37°C verwendet, kann aber laut den Verwendungsvorschriften des Herstellers variiert werden. Nach dem Schneiden wird manchmal die 5'-Phosphatgruppe durch
60 Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm (CIP) entfernt. Dies dient zur Verhinderung einer ungewünschten Reaktion der spezifischen Stelle in einer nachfolgenden Ligasereaktion (z. B. Zirkularisierung eines linearisierten Plasmids ohne Insertierung eines zweiten DNA-Fragmentes). Wenn nicht anders angegeben, werden DNA-Fragmente nach dem Schneiden mit Restriktionsendonukleasen normalerweise nicht dephosphoryliert. Reaktionsbedingungen für die Inkubation mit alkalischer Phosphatase sind z. B. dem M13 Cloning und Sequencing Handbuch (Cloning and Sequencing Handbook, Fa Amersham, PI/129/83/12) zu entnehmen. Nach
65 der Inkubation wird Protein durch Extraktion mit Phenol und Chloroform entfernt und die DNA aus der wäßrigen Phase durch Zusatz von Ethanol präzipitiert.

"Isolierung" eines bestimmten DNA-Fragments bedeutet die durch den Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente Auftrennung der z. B. auf einem 1% Agarosegel. Nach der Elektrophorese und dem Sichtbarmachen der DNA im UV-Licht durch Anfärben mit Äthidumbromid (EtBr) wird das gewünschte Fragment anhand mitaufgetragener Molekulargewichtsmarker lokalisiert und durch weitere Elektrophorese an DE 81 Papier- (Schleicher und Schüll) gebunden. Die DNA wird durch Spülen mit Niedrigsalzpuffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris pH = 7,5, 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend mit einem Hochsalzpuffer (1 M NaCl, 20 mM Tris pH = 7,5, 1 mM EDTA) eluiert. Die DNA wird durch Zusatz von Äthanol präzipitiert.

"Transformation" bedeutet das Einbringen von DNA in einen Organismus, so daß die DNA dort replizierbar ist, entweder extrachromosomal oder chromosomal integriert. Transformation von *E. coli* folgt der im M13 Cloning and Sequencing Handbuch (Cloning and Sequencing Handbook, Fa. Amersham, PI/129/83/12) angegebenen Methode.

"Sequenzieren" einer DNA bedeutet die Bestimmung der Nukleotidsequenz. Dazu wird zunächst die zu sequenzierende DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, und die Fragmente werden in entsprechend geschnittene M13 mp 8, mp 9, mp 18 oder mp 19 Doppelstrang DNA eingebracht, oder es werden die DNA mittels Ultraschall fragmentiert, die Enden repariert und, die gröbenselektierten Fragmente in Sma I geschnittene, dephosphorylierte M13 mp 8 DNA eingebracht (Shotgun Methode). Nach der Transformation von *E. coli* JM 101 wird Einzelstrang DNA aus rekombinanten M13 Phagen entsprechend dem M13 Cloning and Sequencing manual (Cloning and Sequencing Handbook, Fa. Amersham, PI/129/83/12) isoliert und nach der Dideoxymethode (35) sequenziert. (Als Alternative zur Verwendung des Klenowfragment der *E. coli* DNA Polymerase I bietet sich dabei die T7-DNA-Polymerase an ("Sequenase, Fa. United States Biochemical Corporation). Die Sequenzreaktionen werden entsprechend dem Handbuch "Sequenase: Step-by-Step Protocols for DNA Sequencing With Sequenase" durchgeführt.)

Eine weitere Sequenziermethode besteht im Klonieren der zu sequenzierenden DNA in einen Vektor, der unter anderem einen Replikationsursprung eines DNA-Einzelstrangphagen (M13, f1) trägt (z. B. Bluescribe oder Bluescript M13 von Stratagene). Nach Transformation von *E. coli* JM101 mit dem rekombinanten Molekül können die Transformanten mit einem Helferphagen, z. B. M13K07 oder R408 von Progema, infiziert werden. Als Resultat erhält man eine Mischung aus Helferphagen und verpacktem, einzelsträngigem rekombinanten Vektor. Die Aufarbeitung der Sequenzvorlage (Template) erfolgt in Analogie zu der M13-Methode. Die Auswertung der Sequenzen erfolgt mittels der ursprünglich von R. Staden (32) entwickelten und von Ch. Pieler (33) modifizierten Computerprogramme.

"Ligieren" bezieht sich auf den Prozeß der Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Enden von Doppelstrang-DNA-Fragmenten. Üblicherweise werden zwischen 0,02 und 0,2 µg DNA-Fragmente in 10 µl mit etwa 5 units T4-DNA Ligase ("Ligase") in einer geeigneten Pufferlösung ligiert (33) (T. Maniatis et al., Molecular cloning, 1982, p. 474).

"Präparation" von DNA aus Transformanten bedeutet die Isolierung der Plasmid DNA aus Bakterien mittels der alkalischen SDS-Methode, modifiziert nach Birnboim und Doly (T. Maniatis et al., Molecular Cloning, 1982, pp. 368—369) unter Weglassen des Lysozyms. Dabei werden die Bakterien aus 1,5 bis 50 ml Kultur verwendet.

"Oligonukleotide" sind kurze Polydesoxynukleotide, die chemisch synthetisiert werden. Dazu wurde der Applied Biosystems Synthesizer Modell 381A verwendet. Die Oligonukleotide werden entsprechend dem Modell 381A User Manual (Applied Biosystems) aufgearbeitet. Sequenzprimer werden ohne weitere Reinigung direkt eingesetzt. Andere Oligonukleotide werden bis zu einer Kettenlänge von 70 durch die "OPC"-Methode gereinigt (OPC = Oligonucleotide purification column, Applied Biosystems, Product Bulletin, January 1988). Längere Oligonukleotide werden durch Polyacrylamidgelelektrophorese (6% Acrylamid, 0,15% Bisacrylamid, 6 M Harnstoff, TBE-Puffer) gereinigt und nach der Elution aus dem Gel über eine Gel-25 Sepharosesäule entsalzt.

Beispiel 2

Herstellung von TNF-Bindungsprotein-spezifischen Hybridisierungs sonden

Die Auswahl der Oligonukleotide wurde im Hinblick auf deren Verwendung zur Amplifizierung von cDNA mittels PCR getroffen:

a) Aus der N-terminalen Aminosäuresequenz des TNF-Bindungsproteins (erhalten aus Vorversuch 10 und Beispiel 1, Fraktion 1)

Asp—Ser—Val—Cys—Pro—Gln—Gly—Lys—Tyr—Ile—His—Pro—Gln—

wurde ein Heptapeptid-Bereich ausgewählt, der die niedrigste Komplexität eines gemischten Oligonukleotids zum Hybridisieren an cDNA zuläßt:

Es sind dies die Aminosäuren 6 bis 12. Um die Komplexität des Mischoligonukleotids herabzusetzen, wurden vier Mischoligonukleotide mit einer Komplexität von jeweils 48 hergestellt. Die Oligonukleotide wurden in Richtung der mRNA hergestellt, sie sind somit zum 3'Ende der Sequenz orientiert:

Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro

5'CAA GGT AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/1 EBI-1639
 G G C C C
 A

5'CAA GGC AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/2 EBI-1640
 G G C C C
 A

5'CAA GGA AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/3 EBI-1641
 G G C C C
 A

5'CAA GGG AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/4 EBI-1642
 G G C C C
 A

b) Aus der Aminosäuresequenz eines tryptischen Peptides (Fraktion 11 des tryptischen Verdaus) der Aminosäuresequenz

Glu-Cys-Glu-Ser-Gly-Ser-Phe-Thr-Ala-Ser-(Glu/Cys)-Asn-Asn-Lys (vgl. Beispiel 1)

wurde ein Peptid-Bereich ausgewählt und ein weiterer Satz von Mischoligonukleotiden synthetisiert:

TNF-BP #4/5: 3'AAA TGA CGG AGA CTC TTG TTG TT CCTAGGG 5'
 (EBI-1653) G G T T T
 T

TNF-BP #4/6: 3'AAA TGA CGG TCA CTC TTG TTG TT CCTAGGG 5'
 (EBI-1654) G G T G T
 T

TNF-BP #4/7: 3'AAA TGA CGG AGA ACA TTG TTG TT CCTAGGG 5'
 (EBI-1657) G G T T G
 T

TNF-BP #4/8: 3'AAA TGA CGG TCA ACA TTG TTG TT CCTAGGG 5'
 (EBI-1658) G G T G G
 T

Die Oligonukleotide wurden komplementär zur mRNA synthetisiert und sind somit zum 5'Ende der Sequenz orientiert. Um das amplifizierte DNA-Fragment im Anschluß an die PCR effizient klonieren zu können, wurde auch ein BamHI-Linker am 5'Ende der Oligonukleotide vorgesehen. Werden z. B. die Oligonukleotide TNF-BP # 4/5–8 gemeinsam mit TNF-BP # 3/1–4 für die PCR an der gesamten Lambda-DNA einer Bibliothek eingesetzt, kann ein etwa resultierendes DNA-Fragment mit BamHI nachgeschnitten werden. Die Partner-Oligonukleotide ergeben ein gerades Ende am 5'Terminus, das Fragment kann somit in die SmaI-BamHI-Stellen eines geeigneten Vektors kloniert werden.

Jedes Mischoligonukleotid TNF-BP # 4/5 bis 8 ist eine Mischung aus 48 Einzelnukleotiden und berücksichtigt einige Codons nicht, und zwar:

Thr	ACG
Ala	GCG und GCT
Ser	TCG und TCC
Asn	AAT

Bei GCT wird die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß das zu GCC (Ala) komplementäre Triplet CGG durch Ausbildung einer G–T-Brücke wirksam sein kann, bei TCG (Ser) und AAT (Asn) gilt dasselbe bezüglich AGT bzw. TTG.

ACG, GCG und TCG sind äußerst seltene Codons (CG-Regel) und wurden deshalb nicht berücksichtigt.

Beispiel 3

Amplifizierung einer für TNF-BP codierenden Teilsequenz aus einer cDNA-Bibliothek

a) Isolierung von Lambda-DNA einer cDNA-Bibliothek

Die Herstellung der cDNA-Bibliothek erfolgte nach der in der EP-A1-02 93 567 für die humane plazentale cDNA-Bibliothek beschriebenen Methode mit dem Unterschied, daß als Ausgangsmaterial 10^9 Fibrosarkomzellen der Zelllinie HS 913 T, die unter Stimulierung mit humanem TNF- α (10 ng/ml) hochgezüchtet worden waren, verwendet wurden. Statt Lambda gt10 wurde Lambda gt11 verwendet (cDNA Synthese: Amersham RPN 1256; EcoRI verdaute Lambda gt 11 Arme: Promega Biotech; in vitro Verpacken der ligierten DNA: Gigapack Plus, Stratagene).

5 ml des Phagenüberstandes der amplifizierten cDNA Bibliothek der humanen Fibrosarkom Zelllinie HS913T in Lambda gt11 wurden mit 0,5 μ g RNase A und 0,5 μ g DNase I versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Mischung wurde 10 min bei 5000 xg zentrifugiert, der Überstand durch Extraktion mit Phenol und Chloroform von Protein befreit und die DNA aus der wäßrigen Phase durch Zusatz von Ethanol präzipitiert. Die Lambda-DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris pH = 7,5; 1 mM DETA) gelöst.

b) PCR-Amplifizierung einer TNF-BP-Sequenz aus einer cDNA-Bibliothek

Für die Anwendung der PCR auf DNA der HS913T cDNA-Bibliothek wurden 16 Einzelreaktionen durchgeführt, in welchen jeweils eines der 4 Mischoligonukleotide EBI-1639, EBI-1540, EBI-1641, EBI-1642 als erster Primer und eines der vier Mischoligonukleotide EBI-1653, EBI-1654, EBI-1657, EBI-1658 als zweiter Primer eingesetzt wurde. Jedes dieser Mischoligonukleotide enthält 48 verschiedene Oligonukleotide gleicher Länge. Die Amplifizierung mittels PCR fand in 50 μ l Reaktionsvolumen, enthaltend 250 ng Lambda-DNA der cDNA-Bibliothek, 50 mM KCl, 10 mM Tris pH = 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Gelatine, 0,2 mM jedes der 4 desoxy-Nukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), je 200 pMol erster und zweiter Primer, 1,25 Einheiten Tag Polymerase [Perkin-Elmer Cetus] statt. Um die Verdunstung zu verhindern, wurde die Lösung mit einigen Tropfen Mineralöl (0,1 ml) überschichtet. Die PCR wurde in einem DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus) folgendermaßen durchgeführt: Die Proben wurden 5 Minuten auf 94°C erhitzt, um die DNA zu denaturieren, und anschließend 40 Amplifikationszyklen unterworfen. Ein Zyklus bestand aus 40 Sekunden Inkubation bei 94°C, 2 Minuten Inkubation bei 55°C und 3 Minuten Inkubation bei 72°C. Am Ende des letzten Zyklus wurden die Proben für weitere 7 Minuten bei 72°C inkubiert, um sicherzustellen, daß die letzte Primer-Verlängerung vollständig verläuft. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit Phenol und Chloroform von Protein befreit und die DNA mit Äthanol präzipitiert.

5 μ l jeder der 16-PCR-Proben wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung bestimmt. Die stärkste DNA-Bande, ein Fragment von 0,16 kb Länge, war in den PCR-Proben zu sehen, die mit dem Oligonukleotid EBI-1653 als erstem Primer und einem der Oligonukleotide EBI-1639, EBI-1640, EBI-1641 oder EBI-1642 als zweitem Primer amplifiziert worden waren. Da die mit dem Primerpaar EBI-1653 und EBI-1642 amplifizierte Probe die größte Menge an diesem 0,16-kb-DNA-Fragment enthielt, wurde diese Probe für die weitere Aufarbeitung ausgewählt.

Beispiel 4

Klonierung und Sequenzierung eines durch PCR Amplifikation gewonnenen DNA-Fragments

Das erhaltene PCR-Produkt der Primer EBI-1642 und EBI-1653 wurde mit BamHI geschnitten und nachfolgend elektrophoretisch in einem Agarosegel (1,5% NuSieve GTG Agarose plus 1% Seakem GTG Agarose, FMC Corporation) nach der Größe aufgetrennt. Die Hauptbande, ein DNA-Fragment von 0,16 kb Länge, wurde aus dem Gel elektroeluiert und mit Ethanol präzipitiert. Dieses DNA-Fragment wurde mit BamHI/SmaI geschnittenem Plasmid pUC18 (Pharmacia) ligiert und E. coli JM101 mit dem Ligationsgemisch transformiert. Die nach der Minipräparationsmethode hergestellten Plasmide wurden durch Schneiden mit den Restriktionsenzymen PvuII und EcoRI-BamHI und nachfolgender Elektrophorese in Agarosegelen charakterisiert. Das Plasmid pUC18 enthält zwei Schnittstellen für PvuII, die in einem 0,32 kb DNA-Fragment die Polyklonierstelle flankieren. Sehr kurze DNA-Inserts in der Polyklonierstelle des Plasmids können nach Schneiden mit PvuII leichter im Agarosegel sichtbar gemacht werden, da sich die Länge um 0,32 kb vergrößert. Durch Schneiden mit EcoRI und BamHI kann das in den mit BamHI und SmaI geschnittenen Plasmidvektor ligierte DNA-Fragment inklusive einiger Basenpaare der Polylinkersequenz erhalten werden. Ein Klon mit dem gewünschten Insert wurde als pTNF-BP3B bezeichnet. Das gesamte DNA-Insert dieses Klon wurde nach Subklonieren eines EcoRI-BamHI-Fragments in M13mp18 (Pharmacia) nach der modifizierten Dideoxy Methode mit Sequenase (United States Biochemical Corporation) sequenziert.

Die Analyse der durch PCR-amplifizierten DNA ergab folgende Sequenz (nur der nicht kodierende Strang ist abgebildet, darüber die abgeleitete Aminosäuresequenz):

S

10

15

20

30

35

- 40

synergize with interferons.

Nature (Lond.), 323: 819—822.

12. Cerami, A., and B. Beutler. 1988. The role of cachectin in endotoxic shock and cachexia. Immunol. Today. 9: 28—31.

13. Tracey, K. J., B. Beutler, S. F. Lowry, J. Merryweather, S. Wolfe, I. W. Milsark, R. J. Hariri, T. J. Fahey III, A. Zentella, J. D. Albert, G. T. Shires, and A. Cerami. 1986. Shock and tissue injury induced by recombinant human recombinant human cachectin. Science (Wash. D. C.), 234: 470—474. 5

14. Tracey, K. J., Y. Fong, D. G. Hesse, K. R. Manogue, A. T. Lee, G. C. Kuo, S. F. Lowry, and C. Cerami. 1987. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. Nature (Lond.), 330: 662—666. 10

15. Piguet, P. F., G., Grau, B., Allet, and P., Vassalli. 1987. Tumor necrosis factor (TNF) is an important mediator of the mortality and morbidity induced by the graft-versus-host reaction (GHVR). Immunobiol. 175: 27

16. Waage, A., A. Halstensen, and T. Espevik, 1987. Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. Lancet. ii: 355—357. 15

17. Seckinger, P., J. W. Lowenthal, K. Williamson, J.-M. Dayer and H. R. MacDonald. 1987. A urine inhibitor of interleukin 1 activity that blocks ligand binding. J. Immunol. 139: 1546—1549. 20

18. Strober, W., and T. A. Waldmann. 1974. The role of the kidney in the metabolism of plasma proteins. Nephron. 13: 35—66.

19. Tejedor, F., and J. P. G. Ballesta. 1982. Iodination of biological samples without loss of functional activity. Analyt. Biochem. 127: 143—149.

20. Gullberg, U., E. Nilsson, M. G. Sarngadharan, and I. Olsson. 1986. T Lymphocyte-Derived Differentiation-Inducing Factor Inhibits Proliferation of Leukemic and Normal Hemopoietic Cells. Blood 6, 1986: 1333—1338. 25

21. Peetre, C., U. Gullberg, E. Nilsson, and I. Olsson. 1986. Effects of Recombinant Tumor Necrosis Factor on Proliferation and Differentiation of Leukemic and Normal Hemopoietic Cells in Vitro. J. Clin. Invest. 78: 1694—1700. 30

22. Beutler B., Cerami A., Tumor Necrosis, cachexia, shock, and inflammation: A common mediator. Ann. Rev. Biochem. 57: 505—18, 1988.

23. Oliff A., Defeo-Jones D., Boyer M. et al. Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice. Cell 1987: 555—63.

24. Seckinger P. Isaaz S., Dayer J. M. A human inhibitor for tumor necrosis factor a. J. Exp. Med. 1988: 1511—6. 35

25. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 1970; 227: 680—4.

26. Hewick R. M., Hunkapiller M. W., Hood L. E., Dreyer W. J. A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. J. Biol. Chem. 1981; 256: 7990—7.

27. Liao Z., Grimshaw R. S., Rosenstreich D. L. Identification of a specific interleukin I inhibitor in the urine of febrile patients. J. Exp. Med. 1984; 159: 126—36. 40

28. Seckinger P., Williamson K., Balavoine J. F. et al. A urine inhibitor of interleukin I activity effects both interleukin Ia and Ib but not tumor necrosis factor a. J. Immunol. 1987: 139: 1541—5.

29. Espevik T., Nissen-Meyer J. A highly sensitive cell line, WEHI 164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. J. Immunol. Meth. 1986; 95: 99—105. 45

30. Oakley, B. R., Kirsch D. R., Morris R. Analyt. Biochem. 1986; 105: 361—363.

31. Saiki, R. K., Science 239 (1988): 487—491.

32. Staden, R., Nucleic Acid Res. 10 (1982): 4731—4751.

33. Pieler Ch., 1987, Dissertation, Universität Wien.

34. Maniatis, T., et al., Molecular Cloning, 1982: p. 474. 50

35. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 74 1977: 5463—5467.

Patentansprüche

1. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Formel

CAG GGG AAA TAT ATT CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC
TGT ACC AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC
TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT
GAG AGC GGC TCC TTC ACA GCC TCA GAA AAC AAC AAG

aufweist oder eine Variante einer DNA dieser Formel darstellt, die hybridisiert mit DNA, ausgewählt aus der Gruppe

- DNA, kodierend für TNF- α -bindendes Protein,
- DNA, kodierend für ein Protein, dessen Prozessierung TNF-BP ergibt,
- DNA, kodierend für ein TNF-BP verwandtes Protein mit der Fähigkeit, TNF- α zu binden, wie cDNA, abgeleitet von durch alternatives Splicing erhaltener mRNA,
- DNA, kodierend für ein Protein, dessen Prozessierung ein TNF-BP verwandtes Protein mit der

Fähigkeit, TNF- α zu binden, ergibt, wie cDNA, abgeleitet von durch alternatives Splicing erhaltener mRNA.

2. DNA, nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Nukleotidsequenz der Formel

```

5      R1  CAG GGG AAA TAT ATT CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC
          TGT ACC AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC
          TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT
10      GAG AGC GGC TCC TTC ACA GCC TCA GAA AAC AAC AAG R2

```

aufweist, wobei R1 und R2 gegebenenfalls vorgesehene Restriktionsschnittstellen sind und/oder die Nukleotidsequenz der Formel gegebenenfalls modifiziert ist, und daß sie mit DNA, kodierend für TNF- α bindendes Protein oder für ein Protein, dessen Prozessierung TNF- α bindendes Protein ergibt, hybridisiert.

3. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit DNA gemäß Anspruch 1 hybridisiert und ausgewählt ist aus der Gruppe der in Anspruch 1 a) bis d) definierten DNAs, einschließlich ihrer degenerierten Varianten.

4. DNA, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit DNA gemäß Anspruch 2 hybridisiert und für TNF- α bindendes Protein bzw. für ein Protein, dessen Prozessierung das TNF- α bindende Protein ergibt, kodiert, einschließlich ihrer degenerierten Varianten.

5. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend eine in Anspruch 3 definierte DNA-Sequenz.

6. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 5 zur Klonierung einer in Anspruch 3 definierten DNA.

7. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 5, replizierbar in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtsorganismen, zur Expression einer in Anspruch 3 definierten DNA, wobei diese DNA funktionell mit Expressionskontrollsequenzen verbunden ist.

8. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend eine in Anspruch 4 definierte DNA-Sequenz.

9. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 8 zur Klonierung einer in Anspruch 4 definierten DNA.

10. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 8, replizierbar in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtsorganismen, zur Expression einer in Anspruch 4 definierten DNA, wobei diese DNA funktionell mit Expressionskontrollsequenzen verbunden ist.

11. Wirtsorganismus, transformiert mit mindestens einem rekombinanten DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 7 oder 10.

12. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer DNA gemäß Anspruch 3 kodiert wird.

13. Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer DNA gemäß Anspruch 4 kodiert wird.

14. Polypeptid nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß es die N-terminale Aminosäuresequenz der Formel

```

40      Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-
          Asn-Asn-Ser-Ile-Cys-Cys-Thr-Lys-Cys-His-Lys-Gly-Thr-
          Tyr-Leu-Tyr-Asn-Asp-Cys-Pro-Gly-Pro-Gly-Gln-Asp-Thr-
          Asp-Cys-Arg-Glu-Cys-Glu-Ser-Gly-Ser-Phe-Thr-Ala-Ser-
45      Glu-Asn

```

aufweist.

15. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach den Ansprüchen 12–14, dadurch gekennzeichnet, daß ein geeigneter Wirtsorganismus mit rekombinanter DNA gemäß Anspruch 3 oder 4 transformiert und gezüchtet wird und das exprimierte Protein isoliert wird.

16. Polypeptid nach einem der Ansprüche 12–14 zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers bei Indikationen, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF- α auftritt.

17. Polypeptid nach einem der Ansprüche 12–14 zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen.

18. Polypeptid nach einem der Ansprüche 12–14 zur Behandlung von infektiösen Erkrankungen.

19. Polypeptid nach einem der Ansprüche 12–14 zur Behandlung von parasitären Erkrankungen.

20. Polypeptid nach einem der Ansprüche 12–14 zur Behandlung von Schockzuständen.

21. Polypeptid nach einem der Ansprüche 12–14 zur Behandlung von pathologischen Zuständen, die als Nebenwirkungen bei der Therapie mit TNF- α auftreten.

22. Pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend eine die biologische Aktivität von TNF- α wirksam hemmende Menge eines oder mehrerer Polypeptide nach einem der Ansprüche 12–14.

23. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend eine die biologische Aktivität von TNF- β wirksam hemmende Menge eines oder mehrerer Polypeptide nach einem der Ansprüche 12–14.

Hierzu 12 Seite(n) Zeichnungen

Fig. 1

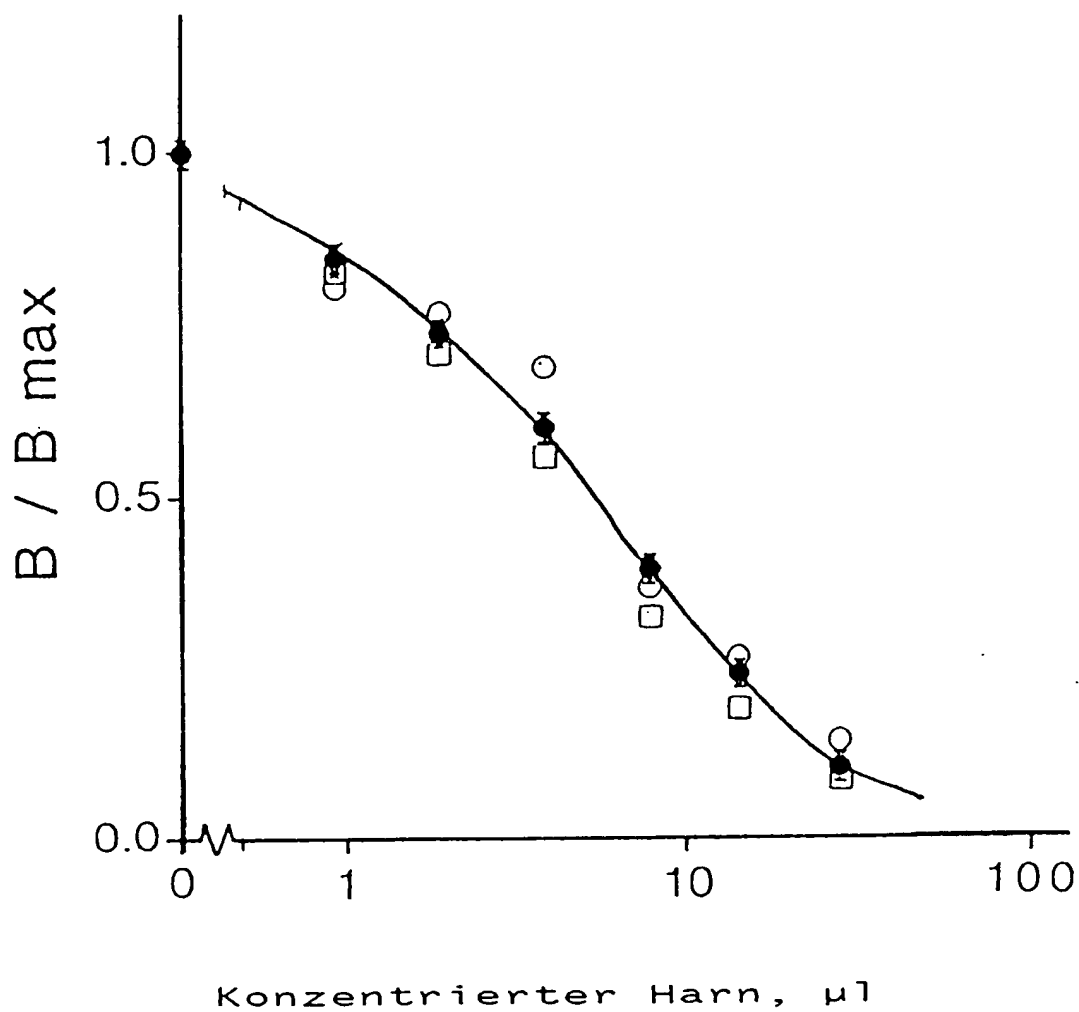


Fig. 2 a

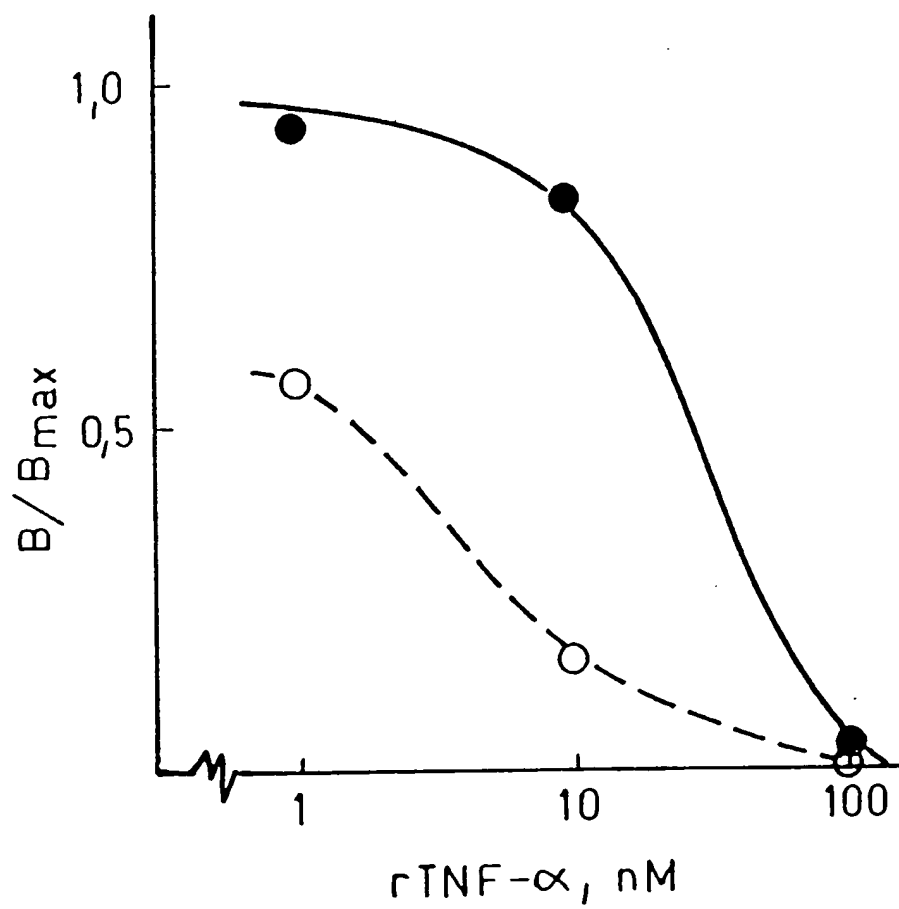


Fig. 2 b

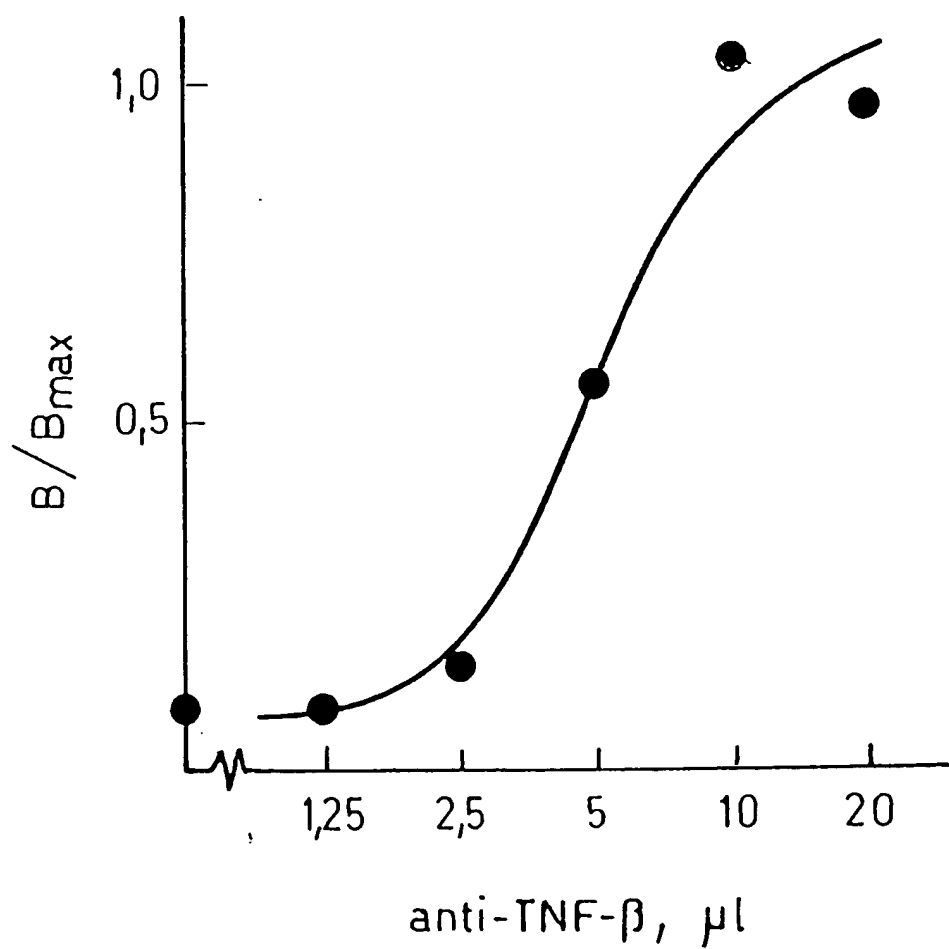


Fig. 3

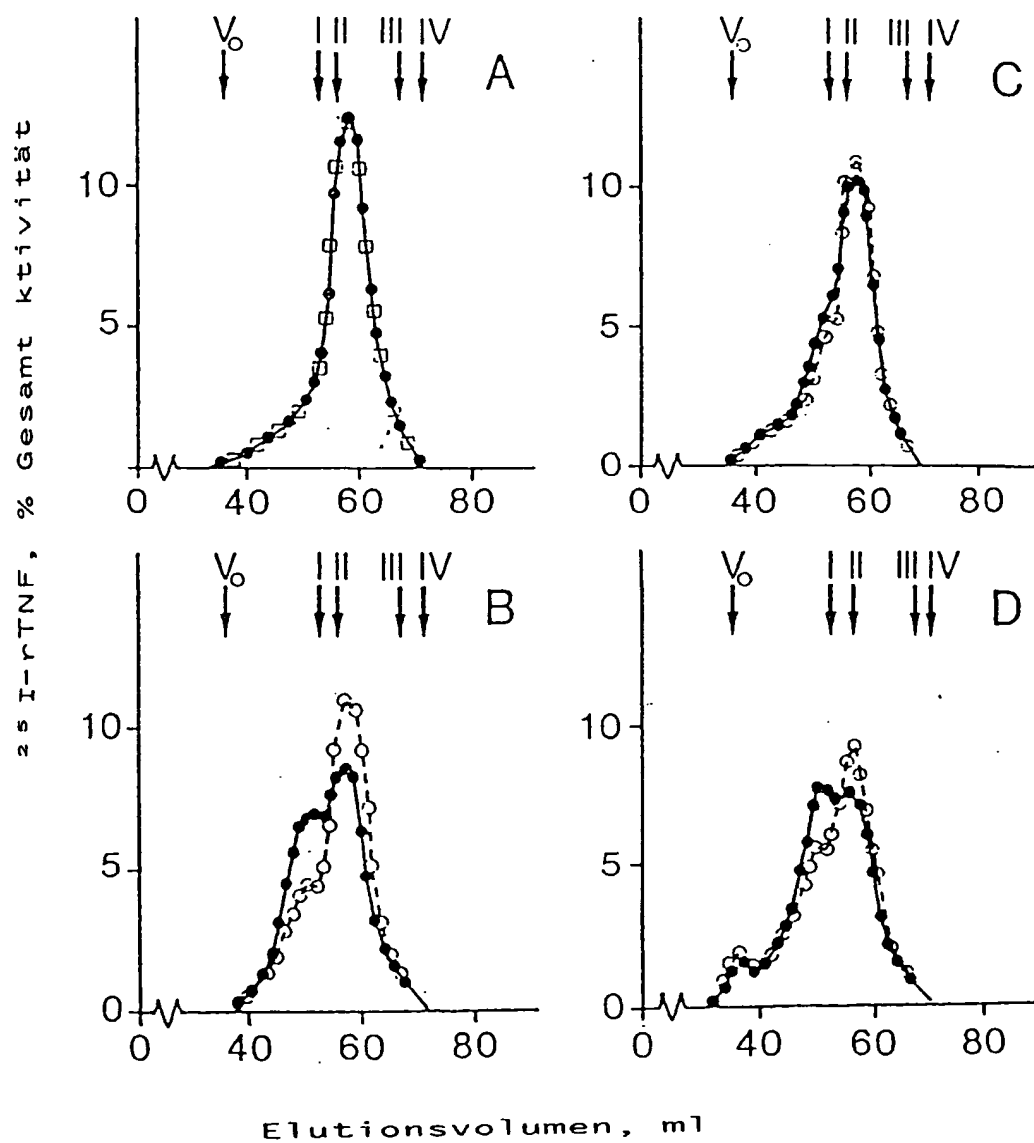
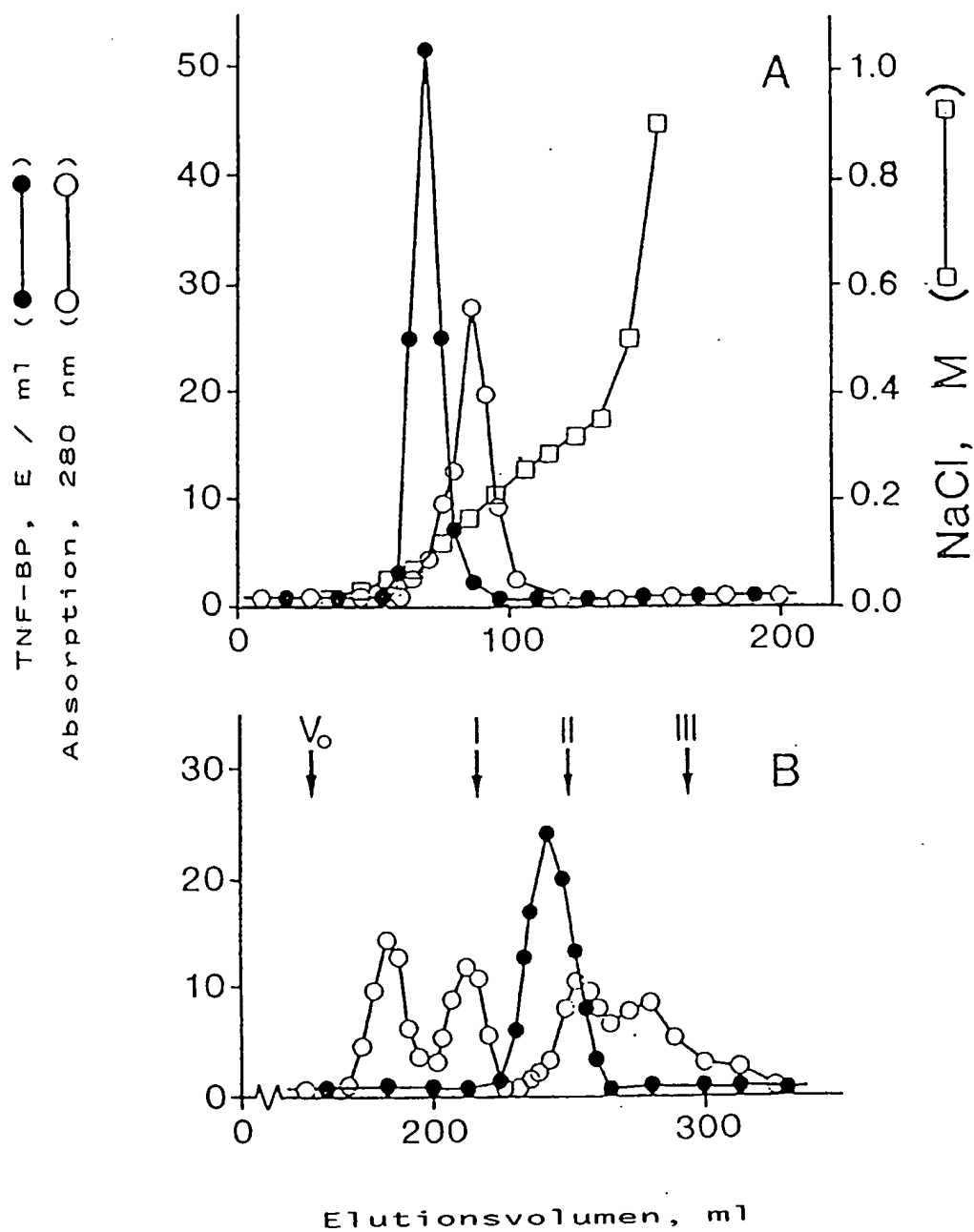


Fig. 4



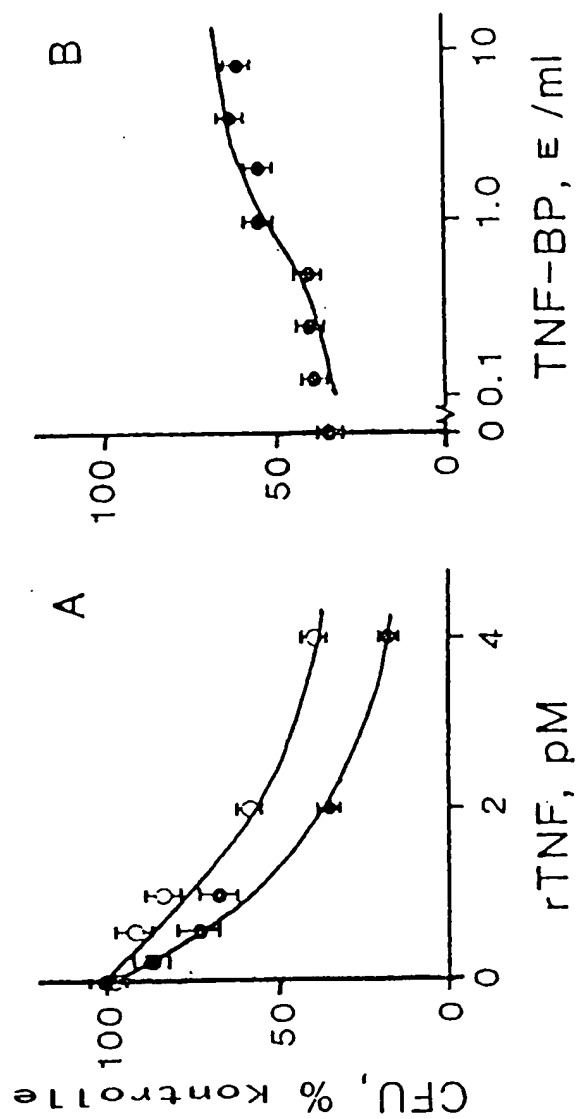


Fig. 5

Fig. 6

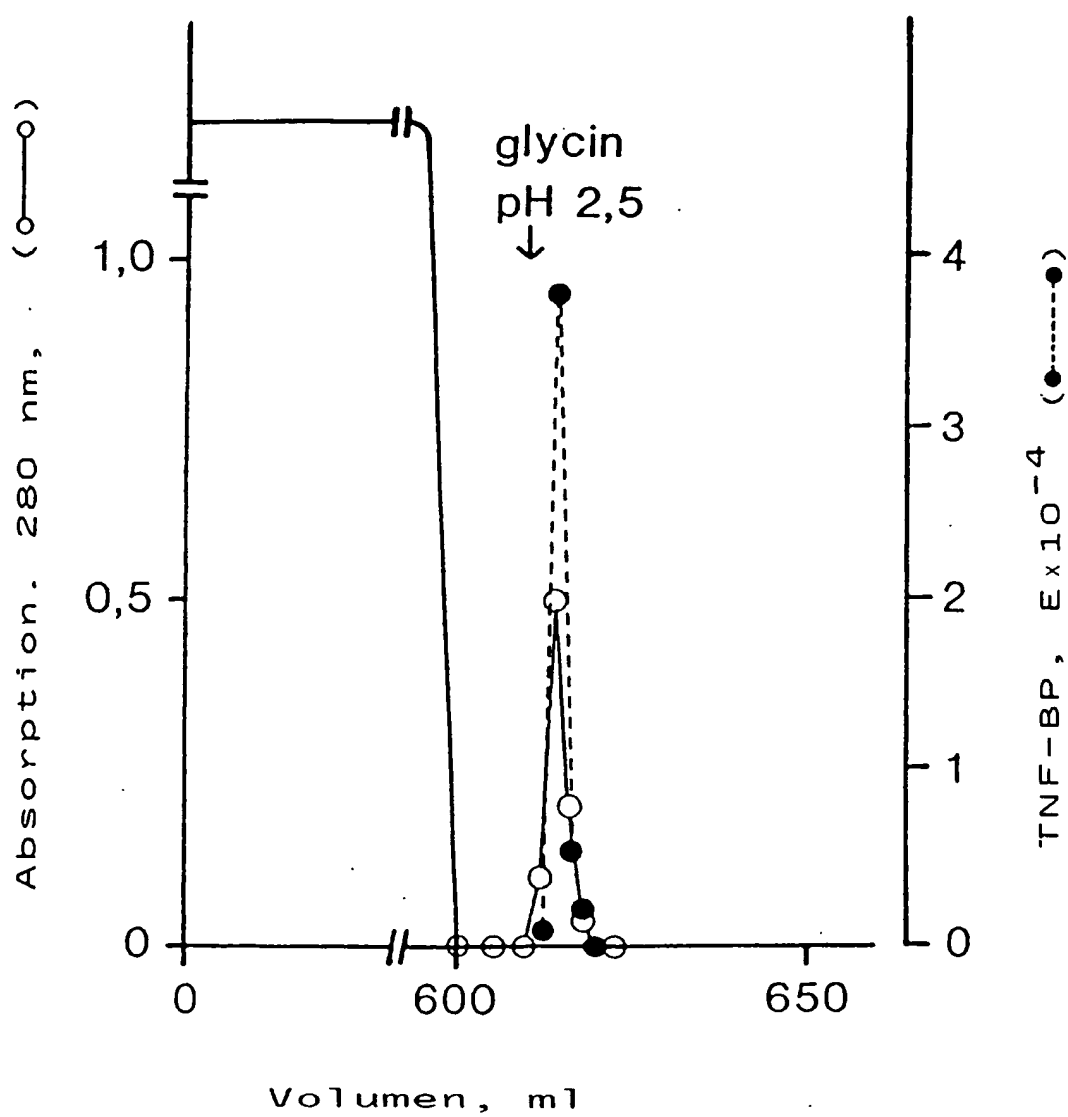


Fig. 7 -

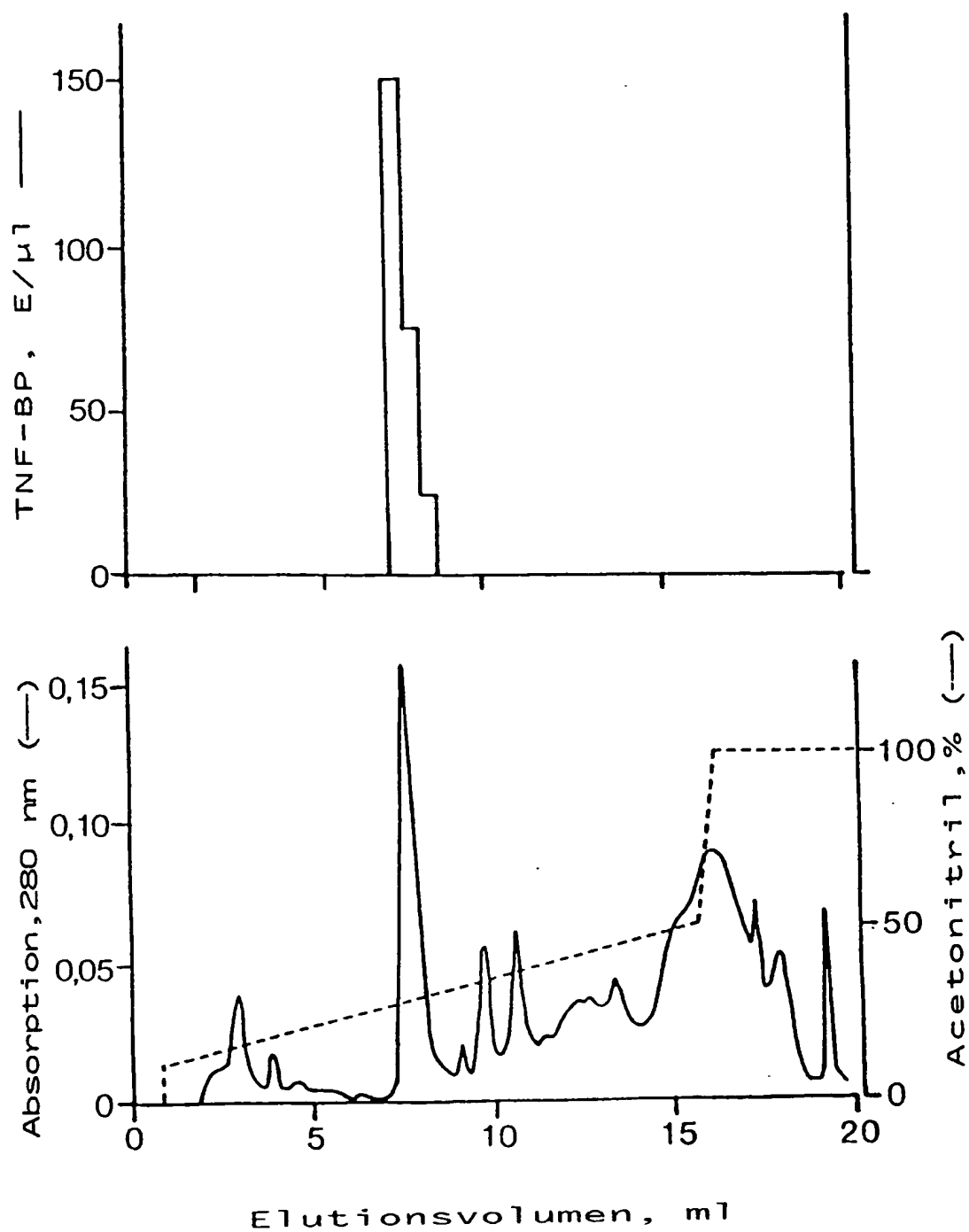


Fig. 8

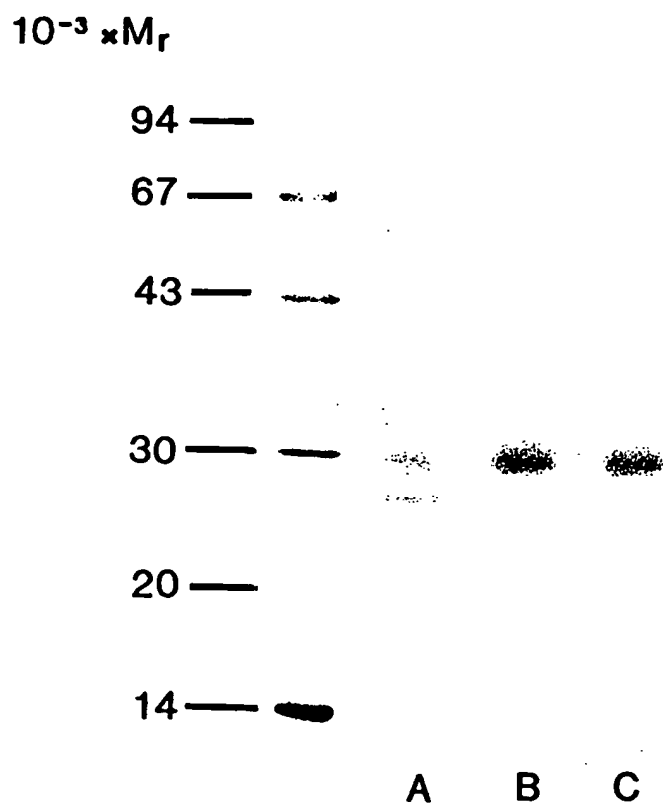


Fig. 9

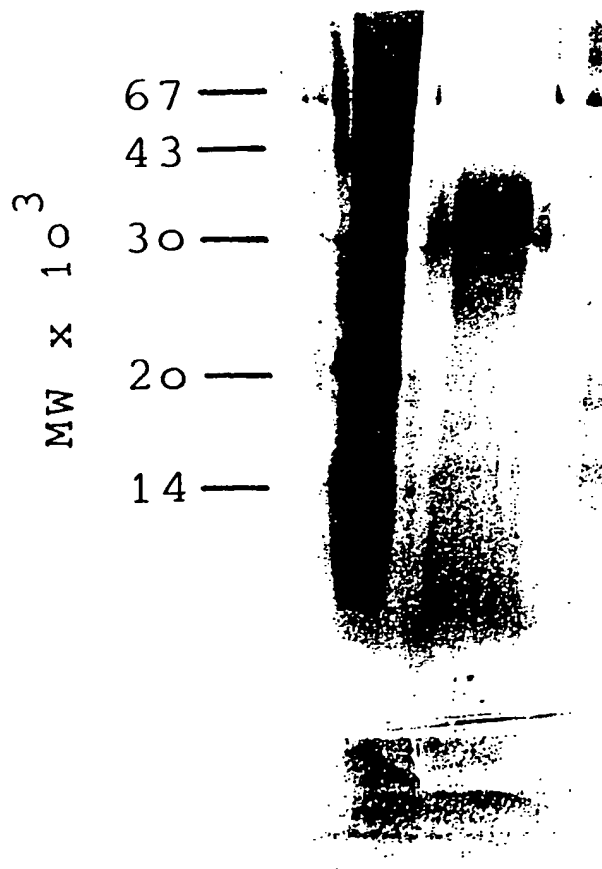


Fig. 10

1 2 3 4



Fig. 11

